

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Fisiología General



TESIS DOCTORAL

Isoenzimas de la fosfatasa alcalina : su utilidad en la clínica

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María del Carmen Coca Martín

Madrid, 2015

M^a del Carmen Coca Martín

TP
1980

~~667~~



* 5 3 0 9 8 5 3 3 3 X *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

x-53-074391-3

**ISOENZIMAS DE LA FOSFATASA ALCALINA:
SU UTILIDAD EN LA CLINICA**

Departamento de Fisiología General
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid
1980



BIBLIOTECA

© María del Carmen Coca Martín
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1980
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-14664-1980

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

ISOENZIMAS DE LA FOSFATASA ALCALINA :

SU UTILIDAD EN LA CLINICA

Tesis presentada para optar al
grado de Doctor en Medicina.

Autor:

Ma. del Carmen Coca Martín

Director:

Prof. Dr. D. Jorge Tamarit Torres

Madrid, mayo 1.979.

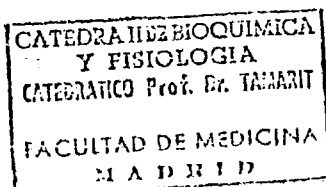
CATEDRA 2.ª DE FISIOLOGIA

Prof. Dr. J. Tamarit
Facultad de Medicina
(Ciudad Universitaria)
MADRID-3

D. JORGE TAMARIT TORRES, CATEDRATICO DE FISIOLOGIA
GENERAL, QUIMICA BIOLOGICA Y FISIOLOGIA ESPECIAL DE
LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTEN
SE DE MADRID.

C E R T I F I C O: Que Da. Ma. DEL CARMAN COCA
MARTIN, ha desarrollado bajo mi dirección el
trabajo "Isoenzimas de Fosfatasa alcalina, su
utilidad en clínica", apto a mi juicio para
ser presentado como tesis doctoral.

Y para que conste y a petición del interesado,
expido el presente certificado en Madrid a die
ciocho de mayo de mil novecientos setenta y
nueve.



A mi esposo y a mis hijos

PROLOGO

Podría decirse que una tesis doctoral es el resultado de parte de una vida dedicada a la investigación.

En este caso tal proyecto científico sería el resultado de un esfuerzo personal que saliendo de la tarea profesional se ha dedicado mucho tiempo extra a la consecución de esta memoria.

Pero también se entiende con frecuencia la tesis doctoral como el inicio o primer ensayo de investigación. Esta tesis no es el umbral de mi tarea investigadora. Varios ensayos científicos, anteriormente publicados, habían disciplinado metodológicamente mi pensamiento, a la par que me familiarizaba con el método científico. Es evidente asimismo que no tengo la pretensión de que esta investigación sea una obra definitiva en la línea de la perfección, ni que ella se convierta en el exponente último y decisivo de mi dedicación y aporte científico, ya que a medida que profundizaba en el estudio de las Isoenzimas de la Fosfatasa Alcalina más hipótesis surgían y más difícil se hacía establecer su final, hasta el punto que ahora, al término, pienso que esta tesis puede ser un proyecto estimulante para proseguir en la ardua tarea de la investigación iniciada.

Si tuviera que definir esta tesis, yo señalaría las siguientes notas más características: es ante todo un trabajo serio, fruto de la lenta maduración de muchas horas, días, meses y años de estudio y reflexión. Se trata de una aportación científica, en la que el método experimental se ha seguido con todo el rigor que el exige. Mis repetidas y provechosas entrevistas con el Director de la Tesis, Prof. Dr. J. Tamarit hicieron que los aspectos metodológicos cobraran la importancia primordial que le correspondía.

Otra característica es la complejidad que importa un trabajo de esta naturaleza. Los miles de casos analizados y estudiados han requerido de complicados y sofisticados instrumentos a fin de someterlos a las más variadas comprobaciones técnicas. Sin duda que mi pertenencia a un centro de grandes dimensiones y suficientes medios materiales ha hecho posible esta tesis. Esta misma dificultad me fuerza al gratísimo deber de hacer mención de aquellos que mediata o inmediatamente han hecho posible esta tesis. En la distendida siembra de inquietudes intelectuales, granadas ahora en la tesis que presento, es de justicia recordar en primer lugar a mi padre José Andrés Coca, médico analista de Medina del Campo a su lado y en su rudimentario laboratorio me familiarizó con los instrumentos y técnicas más elementales. Allí el esfuerzo y la intuición tenían que suplir las deficiencias propias de este tipo de centros.

Durante tres años de rotatorio que pasó en el laboratorio del Hospital Clínico San Carlos de Madrid el Dr. R. Valor Perea anima mi esfuerzo en los primeros pasos de la investigación. Otros compañeros de aquella época me brindan sus conocimientos y experiencias. En aquella institución tengo el primer contacto empírico con las Isoenzimas de la LDH bajo la guía del Dr. A. Erroz.

Soy consciente de las valiosísimas aportaciones que me hicieron todos los profesores de la Facultad de Medicina de Valladolid y Madrid con los que tuve contacto en mi carrera. A estos profesores universitarios quiero también dedicarles mi primer recuerdo.

Superada esta fase de iniciación y formación y ya en la etapa más próxima de preparación de la tesis mi sincero reconoci-miento al Dr. A. Martínez (Jefe del Servicio de Bioquímica de la C.S. 1º de Octubre). por su decisivo estímulo para superar la ru-

tina de la diaria tarea y su valiosa orientación hacia el estudio de las Isoenzimas de la Fosfatasa Alcalina. Asimismo ha go presente mi gratitud más emocionada al Dr. Joaquín Hontoria que con el mayor desinterés pone a mi disposición su entusiasmo por la investigación, su experiencia científica, su colaboración constante y la fecundidad de su saber. Como anteriormente he dicho los sabios consejos y las acertadas orientaciones del director de la tesis, Prof. Dr. J. Tamarit, han posibilitado culminar con éxito la realización de este trabajo de investigación.

Quede también constancia de mi recuerdo entrañable y agradecido al Dr. A. Palacios por sus acertadas explicaciones desde la perspectiva de la clínica sobre los múltiples casos estudiados y analizados, así como al Dr. J. Puche, a la Dra. C. Díaz Rubio y a todos los compañeros del laboratorio de la Clínica Primero de Octubre, no solo por su directa colaboración en la solución de múltiples problemas que el tema implicaba sino también porque con una enorme condescendencia han llenado las obligadas ausencias que por mi trabajo quedaban sin cubrir.

I N D I C E

	<u>Pág.</u>
1.- <u>DESCRIPCION GENERAL Y ANTECEDENTES HISTORICOS</u>	
<u>DE LA FOSFATASA ALCALINA</u>	
Prólogo	
Introducción.....	1
1.1.- PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS DE LAS FOS-	
<u>FATASAS ALCALINAS</u>	
1.1.1.- <u>Composición</u>	6
1.1.2.- <u>Estabilidad</u>	9
1.1.2.1.- Temperatura.....	10
1.1.2.2.- Urea.....	12
1.1.2.3.- Iones y agentes quelantes...	13
1.1.2.4.- pH.....	14
1.1.3.- <u>Inhibidores y activadores</u>	15
1.1.4.- <u>Estudio cinético y mecanismo de</u>	
<u>acción enzimática</u>	17
1.1.4.1.- Especificidad de sustrato y	
constante de MICHAELIS.....	18
1.1.4.2.- Influencia entre pH y sustra	
tos.....	21
1.1.5.- <u>Grupos esenciales en los centros</u>	
<u>activos de la enzima</u>	25
1.1.6.- <u>Mecanismo de catálisis de la fos</u>	
<u>fatasa alcalina</u>	26
2.- <u>ISOENZIMAS DE LA FOSFATASA ALCALINA</u>	
2.1.- GENERALIDADES.....	30
2.2.- <u>PROCEDIMIENTOS PARA LA SEPARACION DE ISO</u>	
<u>ENZIMAS</u>	32
2.2.1.- <u>Métodos electroforéticos de separa</u>	
<u>ción de isoenzimas</u>	33
2.2.1.1.- Electroforesis en papel.....	33
2.2.1.2.- Electroforesis en gel de almi-	
dón.....	34

	pág.
2.2.1.3. Electroforesis en agarosa.....	35
2.2.1.4. Electroforesis en acetato de celu losa.....	35
2.2.1.5. Electroforesis en gel de acrilami- da.....	36
2.2.2.- <u>Otros métodos de separación de isoenzimas</u>	37
Electroforesis en gel de Sephadex	
Electroisofocusing	
Técnicas cromatográficas	
2.3.- METODOS DE IDENTIFICACION DE LAS ISOENZIMAS	39
2.3.1.- <u>Identificación de isoenzimas por la posi- ción de las bandas.....</u>	40
2.3.2.- <u>Métodos de identificación de isoenzimas basados en la estabilidad.....</u>	42
2.3.2.1.- Estabilidad al calor.....	43
2.3.2.2.- Estabilidad a la concentración de hidrogeniones.....	45
2.3.2.3.- Inactividad por urea.....	46
2.3.3.- <u>Inhibición por L-fenilalanina.....</u>	47
2.3.4.- <u>Tratamiento con neuroaminidasa.....</u>	49
2.3.5.- <u>Otros procedimientos de identificación de isoenzimas.....</u>	50
EDTA	
Actividad relativa a sustratos	
Propiedades inmunoquímicas	
2.4.- APLICACIONES DE LAS ISOENZIMAS EN CLINICA..	52
3.- <u>PROPOSITO DE LA TESIS.....</u>	58
4.- <u>METODOLOGIA.....</u>	61
4.1.- <u>PREPARACION DE LAS MUESTRAS.....</u>	62
Sueros	
Homogenados de órganos	
Biopsias	

Necropsias	pág.
Preparación del buffer carbonato-bicarbonato	
4.2.- METODO PARA LA DETERMINACION DE LA FOSFATA- SA ALCALINA.....	65
Fundamento	
Reactivos	
Buffer pH 10,1	
Sustrato 2 mg/ml.	
Procedimiento	
Curva de absorbancia del p-nitro-fenol	
4.2.1.- <u>Precisión del método</u>	67
Método automático	
Método manual	
4.2.2.- <u>Linealidad en la determinación de la fos</u> <u>fatasa alcalina</u>	70
Recta de regresión	
4.3.- SEPARACION DE ISOENZIMAS.....	72
4.3.1.- <u>Fundamento del método</u>	73
4.3.2.- <u>Material</u>	73
4.3.3.- <u>Reactivos</u>	74
Buffer del gel	
Solución de acrilamida (Poro 9%)	
Solución de acrilamida (Poro 7%)	
Solución de acrilamida (Poro 4%)	
Solución de persulfato amónico	
Buffer reservorio	
Solución de sacarosa	
Solución de cromógeno	
4.3.4.- <u>Limpieza del material de vidrio</u>	76
4.3.5.- <u>Preparación del gel</u>	76
Soluciones de los poros	
4.3.6.- <u>Electroforesis en el gel</u>	79

	<u>pág.</u>
4.3.7.- <u>Revelado de la actividad enzimática</u>	80
4.3.8.- <u>Densitometría de las bandas del gel</u>	81
4.3.8.1.- <u>Reproductibilidad del densitó</u> <u>metro</u>	82
4.3.8.2.- <u>Precisión en la densitometría</u> <u>de los geles</u>	84
4.3.9.- <u>Precisión en la separación de las</u> <u>isoenzimas</u>	86
5.- <u>RESULTADOS EXPERIMENTALES</u>	91
Generalidades	
5.1.- <u>SUEROS NORMALES</u>	93
Introducción	
Variabilidad del recorrido de la banda anódica	
Número de bandas en el gel	
Ajuste a una curva del número de bandas en los geles	
Variabilidad de la actividad enzimática ge neral y según número de bandas	
5.1.1. <u>Posición de las bandas en el gel de los</u> <u>sueros normales</u>	101
Distribución de frecuencias y posición de bandas	
Posición de bandas en geles de tres ban das	
Posición de las bandas en geles de cua tro bandas	
Posición de las bandas en geles de cin co bandas	
Posición de las bandas en geles con seis bandas	
Posición de las bandas en geles de siete bandas	

	<u>pág.</u>
5.1.2.- <u>Actividad fosfatásica en los geles de los sueros normales.....</u>	111
Actividad fosfatásica de todas las bandas del gel	
Actividad fosfatásica de geles con dos bandas	
Actividad fosfatásica de geles con tres bandas	
Actividad fosfatásica de geles con cuatro bandas	
Actividad fosfatásica de geles con cinco bandas	
Actividad fosfatásica de geles con seis bandas	
Actividad fosfatásica de geles con siete bandas	
5.1.3. <u>Influencia del sexo en el espectro electroforético en sueros normales</u>	121
Actividad fosfatásica en sueros normales según sexo	
Posición de las bandas en los geles según sexo	
Actividad fosfatásica de los geles según sexo	
5.1.4. <u>Influencia de la edad en el espectro electroforético en sueros normales</u>	135
Posición de bandas y diagramas	
Actividad fosfatásica de los geles según la edad	
5.1.5. <u>Influencia de los grupos sanguíneos en el espectro electroforético de sueros normales</u>	141
Actividad fosfatásica de los sueros respecto a grupos sanguíneos	

pág.

Aplicación del t de "Student" en la actividad fosfatásica total de los grupos sanguíneos	
Número de bandas en los geles en relación a los grupos sanguíneos	
Prueba de χ^2 para decidir la dependencia del número de bandas y grupos sanguíneos	
Posición y AF de las bandas en los geles según los grupos sanguíneos	
Actividad fosfatásica de las bandas en los geles	
5.2.- HOMOGENADOS DE ORGANOS SANOS	152
5.2.1. <u>Actividad fosfatásica de los homogenados</u>	152
5.2.2. <u>Número, recorrido y posición preferencial de las bandas en el gel.....</u>	153
5.2.3. <u>Actividad fosfatásica de las bandas del gel.....</u>	157
5.2.4. <u>Estudio de mezclas de homogenados y sueros normales.....</u>	161
5.2.5. <u>Estudio de mezclas de homogenados de órganos.....</u>	169
5.3. SUEROS PATOLOGICOS.....	172
5.3.1. <u>Sueros de enfermedades hepáticas.....</u>	174
5.3.2. <u>Sueros de enfermedades óseas.....</u>	180
5.3.3. <u>Sueros de enfermos con pancreatitis..</u>	187
5.3.4. <u>Sueros de enfermedades renales.....</u>	189
5.3.5. <u>Sueros de enfermedades pulmonares.....</u>	197
5.3.6. <u>Sueros de neoplasias.....</u>	202
5.3.7. <u>Estudio de mezclas de sueros patológicos</u>	212
5.3.8. <u>Estudio de mezclas de homogenados de órganos y sueros patológicos.....</u>	218
5.4. ENSAYOS SOBRE INHIBICIONES.....	227

	<u>pág.</u>
6.- <u>DISCUSION GENERAL</u>	247
6.1. ELECCION DE METODICA.....	248
6.2. MODELOS ELECTROFORETICOS DE SUEROS NORMALES.	254
6.3. MODELOS ELECTROFORETICOS DE HOMOGENADOS DE ORGANOS.....	264
6.4. MODELOS ELECTROFORETICOS DE SUEROS PATOLOGICI- COS.....	269
Sueros de enfermos hepáticos.....	270
Sueros de enfermedades óseas y niños.....	273
Sueros de enfermedades pancreáticas.....	275
Sueros de enfermedades renales.....	277
Sueros de enfermedades pulmonares.....	279
Sueros procedentes de neoplasias.....	282
6.5. ENSAYOS CON INHIBIDORES.....	286
6.6. MEZCLA DE SUEROS HOMOGENADOS.....	290
6.7. IDENTIFICACION DE BANDAS EN EL GEL.....	294
6.8. TRABAJOS QUE PUEDEN DESARROLLARSE COMO CONTI- NUACION A ESTA MEMORIA.....	297
7.- <u>CONCLUSIONES</u>	300
8.- <u>BIBLIOGRAFIA</u>	307
9.- <u>ANEXO</u>	
ANEXO nº1: SUEROS NORMALES.....	340
ANEXO nº2: SUEROS PATOLOGICOS:	
a) Sueros de enfermedades hepáticas...	358
b) Sueros de enfermedades óseas y niños normales.....	363
c) Sueros de enfermos con pancreatitis	365
d) Sueros de enfermedades renales.....	366
e) Sueros de enfermedades pulmonares..	370
f) Sueros de cáncer.....	373

ANEXO n°3: ESTUDIO DE MEZCLAS DE SUEROS.....	<u>pág.</u> 376
ANEXO n°4: ESTUDIO DE MEZCLAS DE HOMOGENADOS DE <u>OR</u> GANOS Y SUEROS PATOLOGICOS.....	378
ANEXO n°5: ESTUDIOS DE HOMOGENADOS DE <u>ÓRGANOS</u>	380
ANEXO n°6: ESTUDIOS DE MEZCLAS DE HOMOGENADOS DE ORGANOS.....	382
ANEXO n°7: ESTUDIO DE MEZCLAS DE HOMOGENADOS DE <u>OR</u> GANOS Y SUEROS NORMALES.....	383
ANEXO n°8: CALCULO DE A.F. EN LAS MEZCLAS DE <u>HOMO</u> GENADOS Y SUEROS.....	385

1. DESCRIPCION GENERAL Y ANTECEDENTES HISTORICOS
=====

1. DESCRIPCION GENERAL Y ANTECEDENTES HISTORICOS

=====

La fosfatasa alcalina, cuya nomenclatura actual es la de ortofosfórico monoester fosfohidrolasa (E.C.3,1,3,1), comprende un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de casi todos los monoésteres de fosfatos dando lugar a fosfato inorgánico, P_i , y el correspondiente alcohol, fenol o azúcar.

Las fosfatasas alcalinas procedentes de tejidos de los mamíferos, particularmente del riñón y la mucosa intestinal, hidrolizan nucleótidos, fosfatos de hexosas, glicerofosfatos, etc., (FERNLEY, 1971).

La demostración de que el cartílago osificado era una fuente rica en fosfatasa alcalina marcó el comienzo de una época de intensa investigación, desarrollándose la hipótesis de que la fosfatasa intervenía en el proceso de la calcificación (ROBISON, 1923) (FERNLEY, 1971). Posteriormente se demostró que la fuente principal de la fosfatasa alcalina se encuentra en los osteoblastos del hueso y es excretada por la bilis (GUTMAN, 1959) (WILKINSON, 1970) (CHEN, 1976).

Aparte del hueso hay otros muchos tejidos ricos en fosfatasa alcalina como son el hígado, la mucosa intestinal, el riñón, la placenta, etc. Sus actividades enzimáticas han sido objeto de un estudio profundo por muchos autores (BODANSKY, 1937) (CLOETENS, 1939) (BODANSKY, 1948) (AHMED y KING, 1959) (HODSON y otros, 1962) (FISHMAN y Col., 1962) (MOSS y KING, 1962) (WILKINSON, 1971) (CHEN, 1976) (SUBRAMONIAM, 1978) etc.

La fosfatasa ósea tiene su máxima actividad enzimática a pH comprendido entre 8,4 y 9,4 (ROBINSON y SOAMES, 1924); si-

milar comportamiento tiene la fosfatasa renal y de la mucosa intestinal (MARTLAND y ROBISON, 1926) (FISHMAN y GHOSH, 1967) (FERNLEY, 1971) presentes en el suero sanguíneo.

En 1927 se observó que la fosfatasa renal después de ser dializada necesita la presencia de iones Mg para recuperar la actividad enzimática inicial. Este hecho ha sido confirmado en trabajos posteriores y desde entonces se agrega el ión Mg, en forma sistemática, en la determinación de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina con independencia de si las muestras han sido dializadas o no y del órgano ensayado (FERNLEY, 1971).

En clínica, despertó interés la fosfatasa alcalina en determinadas situaciones patológicas, tales como ictericias obstructivas (ROBERTS, 1930) (ROBERTS, 1933) (DALGAARD, 1951) (MITHOEFER y RAPOPORT, 1951) (SARLES, 1953) (CARLSTEN, 1961) (BECKER y STAUFFER, 1962) (SEBESTA y col., 1964) (SHERLOCK, 1963) (POPE, 1966) (KLEIN, 1968) (CHEN, 1972, 1973) (RIGHETTI, 1974), en algunas enfermedades óseas como el raquitismo (KAY, 1929) (DOOSE, 1960) (CHEN, 1976), en hiperparatiroidismo (DENT y HARPER, 1962), en hiperfosfatosis ideopática (STEMMERMANN, 1966) (THOMPSON y col., 1969).

La fosfatasa alcalina tiene también importancia para dilucidar la patogenia y la prognosis de diversas enfermedades renales (BURGEN, 1947) (FISHMAN y GHOSH, 1967), así, ha adquirido gran importancia en la necrosis tubular, en los síndromes nefróticos y en la agudización de los cuadros nefríticos (BUTTERWORTH y MOSS, 1963) (BUTTERWORTH y col., 1965) (FISHMAN y GHOSH, 1968).

La fosfatasa placentaria tuvo gran importancia en el valor diagnóstico de un fracaso placentario (HUNTER, 1969) (AIDA y SOTO, 1972), sin embargo, en la actualidad se cree que el valor

de la fosfatasa alcalina placentaria solo tiene importancia en casos aislados como en embarazos sometidos a un control periódico; entonces, resulta significativo cuando se produce una elevación brusca de la actividad en algún momento determinado (BRANDAU, 1976).

En infartos pulmonares se produce también un incremento de la fosfatasa alcalina (NIKKILA, 1959) (DIJKMAN y KLOPPENBORG, 1966).

Se considera la fosfatasa alcalina de gran utilidad en el diagnóstico de enfermos que padecen Hb-E-Talasemia, en la que la actividad fosfatásica se encuentra elevada más de tres veces respecto a la actividad normal (NATH y GHOSH, 1967).

Finalmente, es bien conocida la hiperfosfatasemia en las neoplasias de origen óseo y sus metástasis, en el cáncer hepático y su metástasis, así como en el cáncer pancreático (SCHLANG y MCHENRY, 1962) (FISHMAN y GHOSH, 1967) (CHEN, 1976) y carcinoma gastrointestinal (CROFTON y SMITH, 1978).

La utilización de la fosfatasa alcalina para fines diagnósticos precisa la determinación correcta de la misma, lo que dió lugar a que fuesen desarrollados métodos sensibles para la medida de la actividad fosfatásica (KING y ARMSTRONG, 1934). Los métodos analíticos pueden clasificarse en dos tipos: a) Medida del ión fosfato liberado y b) Medida del alcohol producido.

Historicamente, el primer ester utilizado como sustrato, fué el beta-glicero-fosfato (BODANSKY, 1933). En este método, después de la incubación del suero con el sustrato hay una liberación de ión fosfato, el cual, es medido en una segunda fase por el método de Fiske-Subbarow (FISKE y SUBBAROW, 1925). Método

similar al anterior fué empleado por varios autores (SHINOWARA y col., 1942) (DRIER y col., 1957) (LOWRY y LOPEZ, 1946).

En el grupo de métodos que miden el alcohol liberado, los cuales, son los más utilizados en la actualidad en los laboratorios de Química Clínica, el primer procedimiento usado fué el de King y Armstrong (KING y ARMSTRONG, 1934), en el que el fenol liberado del sustrato fenilfosfato se mide por el método de Folin-Ciocalteau (1929). Más tarde, fueron empleados métodos en los cuales el alcohol liberado presenta color, como el usado por el método Bessey (BESSEY y col., 1946) donde el sustrato es el p-nitrofenilfosfato. En esta misma línea se ha utilizado como sustrato la fenolftaleína-difosfato (KLEIN, READ, RABSON, 1960). También se han utilizado sustratos que tras la hidrólisis enzimática se originan productos fluorescentes tales como beta-naftilfosfato (GREENBERG, 1962) y 4,metil, umbeliferilfosfato (FERNLEY y WALKER, 1965).

Las fosfatasa alcalinas pertenecen al grupo de las transferasas en las cuales un residuo fosforil es transferido directamente de un éster fosfato a un alcohol aceptor (FERNLEY, 1971). Por otra parte, se ha demostrado (ENGSTRON, 1962) que la fosfatasa alcalina pertenece al grupo de las hidrolasas. En el trabajo ultimamente mencionado, se introdujo en el grupo serina de la enzima, un fosfato marcado con fósforo 32 y la fosfoserina marcada pudo ser aislada, después de su incubación, en la glucosa-6-fosfato (32P), llegándose así a la evidencia de que la enzima-fosforil es un intermedio en la hidrólisis de los monoésteres fosfatos.

El estudio de que un ión metal era necesario en la estructura de la fosfatasa alcalina fué realizado por varios autores (MATHIES, 1958) (ENGSTRON, 1961). La fosfatasa del E. Coli

es una metaloenzima con 2-3 gr de Zn por mol de enzima. El metal es esencial para la actividad catalítica y también para el mantenimiento de la estructura de la enzima (FISHMAN y GHOSH, 1967) (FERNLEY, 1971) (CHEN, 1976).

Ha sido un tema muy debatido durante muchos años las diferentes fosfatasas alcalinas procedentes de cada tejido, esto es, las isoenzimas de la fosfatasa alcalina (BELFANTI, 1935). La individualización e identificación de éstas es un problema que ofrece dificultades experimentales. Se han utilizado para este estudio las técnicas empleadas para esta clase de trabajos tales como la respuesta de la enzima a los inhibidores (BODANSKY, 1937), métodos inmunoquímicos (SCHLAMOWITZ y BODANSKY, 1959) (SUSSMAN y col., 1968), etc. Las técnicas electroforéticas han mostrado la existencia de diferencias físicas entre las fosfatasas alcalinas de los tejidos. Sin embargo, aún no está clara, ni precisa, las diferencias existentes entre ellas, quizás el contenido en ácido siálico sea la causa de estas diferencias (SCHLAMOWITZ y BODANSKY, 1959) (MOSS y col., 1961) (HODSON y col., 1962) (ROBISON y PIERCE, 1964) (MOSS y col., 1966) (FERNLEY, 1971).

1.1. PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS DE LAS FOSFATASAS ALCALINAS

1.1.1. Composición

Las fosfatasas alcalinas de los mamíferos han sido muy estudiadas sobre todo en lo que concierne a sus propiedades físicas. Los estudios se han efectuado principalmente en la mucosa intestinal de la ternera, riñón del caballo, hígado de los bovidos, etc.

Respecto a la fosfatasa alcalina humana, la más estudiada

da ha sido la placentaria, la cual, ha podido ser purificada y cristalizada (GHOSH y FISHMAN, 1968) (SUSSMAN y col., 1968). Los homogenados de la enzima fueron estudiados mediante ultrafiltración, inmunoelectroforesis y electroforesis de disco en gel de acrilamida, demostrándose que ésta enzima es un dímero de peso molecular comprendido entre 116000 a 125000 (HARKNESS, 1968) (SUSSMAN y GOTTLIEB, 1969) (FERNLEY, 1971). Este dímero está formado por dos monómeros, los cuales, no tienen que ser necesariamente idénticos, de pesos moleculares de 58000 (SUSSMAN y col., 1968) (MARSHALL y KAPLAN, 1972) (CHEN, 1976). Los estudios genéticos indican que existen 3 subunidades, la F (fast), I (intermediate) y S (slow), las cuales pueden combinarse dando lugar a 6 variantes electroforéticas diferentes, FF, II, SS, FI, FS y IS (ROBSON y HARRIS, 1967) (CHEN, 1976). Además, se ha encontrado una variante poco frecuente llamada D, la cual, se encuentra en individuos de Grecia, Haway, Suiza y Nigeria (CHEN, 1976). Estas variaciones de tipo genético no han sido observadas en otros tejidos ricos en fosfatasa alcalina. Para otros investigadores, hay tres isoenzimas placentarias humanas, separadas en gel de almidón, pero en suero de embarazadas solo se han encontrado dos bandas (BOYER, 1961) (FISHMAN y GHOSH, 1967). Esta contradicción, para algunos autores, pueden ser debidas a diferencias en pesos moleculares (BOYER, 1963) (GHOSH y FISHMAN, 1968) (HARKNESS, 1968) (SUSSMAN y GOTTLIEB, 1969) (GHOSH, 1969) (CHEN, 1976).

La fosfatasa alcalina placentaria es una glicoproteína que contiene fructosa, manosa, galactosa y siete residuos de ácido siálico, estos últimos pueden ser eliminados por incubación con neuroaminidasa (ROBINSON y PIERCE, 1964) (GHOSH, 1969) (MARSHALL y KAPLAN, 1972).

El Zn es un elemento esencial de la enzima y su contenido en la fosfatasa placentaria es del 0,15% (HARKNESS, 1968).

La composición de la fosfatasa placentaria ha sido estudiada por varios autores (HARKNESS, 1968) (GHOSH y FISHMAN, 1968) (SUSSMAN y GOTTLIEB, 1969) (FERNLEY, 1971). Los residuos de aminoácidos de esta fosfatasa se muestra a continuación:

AMINOACIDOS EN LA FOSFATASA PLACENTARIA

<u>AMINOACIDOS</u>	<u>CANTIDAD DE RESIDUOS</u>	<u>AMINOACIDOS</u>	<u>CANTIDAD</u>
Alanina	123 - 104	Lisina	49 - 52
Arginina	65 - 60	Metionina	24 - 24
Asparagina	109 - 100	Phenilalanina	39 - 36
Cisteina	14 - -	Prolina	56 - 60
Glutamina	112 - 108	Serina	52 - 64
Glicocola	100 - 100	Treonina	68 - 68
Histidina	31 - 28	Triptofano	- - -
Isoleucina	38 - 36	Tirosina	37 - 36
Leucina	87 - 88	Valina	70 - 80

El ácido siálico se encuentra presente en las fosfatasas alcalinas procedentes del hueso, riñón, hígado y placenta, hallándose ausente en la fosfatasa intestinal (ROBINSON y PIERCE, 1964) (GHOSH, 1969) (WILKINSON, 1970) (MARSHALL y KAPLAN, 1972) (CHEN, 1976).

El coeficiente de la velocidad de sedimentación de las fosfatasas alcalinas de hueso, hígado e intestino, determinadas por gradiente de centrifugación en sacarosa es similar en todas, aproximadamente de 7,5 S. Corresponde a unos pesos moleculares de alrededor de 150.000 (KAPLAN, 1972). El peso molecular de la fosfatasa alcalina renal es de 130.000 (BOYER, 1961). La fosfatasa en

contrada en la orina es la mitad, en peso molecular, que la renal (BUTTERWORT, 1965).

Mediante la técnica de filtración, en columna de Sephadex G-200, los pesos moleculares de las fosfatasas en los tejidos de hígado, intestino, hueso y riñón son de 225.000, 190.000, 180.000 y 170.000 respectivamente (MOSS, 1970). Se desconoce la causa de esta diferencia en los pesos moleculares entre ultracentrifugación y columnas de Sephadex; posiblemente, sea debido al porcentaje de carbohidratos (KAPLAN, 1972).

Con técnicas inmunológicas se observan diferencias estructurales. Cuando se inyectan al conejo homogenados de los tejidos, se observan tres grupos antigénicos: el primer grupo incluye hígado, hueso, bazo y riñón, el segundo la fosfatasa intestinal y en el tercero la placentaria. Se encontró una baja especificidad por tratarse de una reacción cruzada entre los antígenos y anticuerpos de los diferentes tejidos (BOYER, 1963) (KAPLAN, 1972). Si se usan como antígenos tejidos purificados se ha comprobado una mayor especificidad de la fosfatasa correspondiente al tejido considerado. Así, se encuentra que los anticuerpos de la fosfatasa hepática y placentaria eran específicos de sus respectivos homólogos, presentando por ello, especificidad de órgano y no presentando reacción con las fosfatasas alcalinas de hueso, intestino y riñón (SUSSMAN y col., 1968).

1.1.2. Estabilidad

La estabilidad se puede considerar como la resistencia que ofrece la enzima a la pérdida de su actividad catalítica por determinados agentes. Esta pérdida de actividad puede ser total o recuperarse parcialmente una vez que ha cesado la acción del

agente. Generalmente, la estabilidad está ligada a cambios estructurales, como forma terciaria de la proteína o bién bloques zonales.

Los agentes pueden ser de varios tipos:

Físicos:	Temperatura, tiempo.
Físico-químicos:	pH, urea, iones metálicos, quelantes.
Químicos:	Neuroaminidasa, aminoácidos.

El conocimiento de la estabilidad de las enzimas frente a la acción de diversos agentes tiene importancia analítica y por tanto clínica.

1.1.2.1. Temperatura

A la temperatura ambiente la fosfatasa alcalina es generalmente muy estable en solución neutra o ligeramente alcalina. Al aumentar la temperatura la enzima sufre transformaciones que pueden llegar a ser irreversibles.

El efecto de la temperatura fué estudiado con fines diagnósticos para distinguir los orígenes de las diferentes fosfatasas (MOSS, 1970) (WILKINSON, 1970) (FERNLEY, 1971) (KAPLAN, 1972) (TSUNG, 1974) (BOTTEY, 1975) (LILLIAN, 1976) (KAZUMASA, 1977).

La fosfatasa ósea procedente de sueros de pacientes con enfermedades óseas queda prácticamente inactivada a la temperatura de 56°C durante 15 minutos. La fosfatasa hepática es algo más resistente al calor. Las isoenzimas placentaria e intestinal son mucho más resistentes al calor que las isoenzimas ósea y hepática. La actividad enzimática residual después de 15 minutos a 56°C

es de 21, 11, 90 y 87% respecto a la actividad inicial, para las fosfatasa hepática, ósea, intestinal y placentaria (KAPLAN, 1972). La isoenzima hepatobiliar presenta al calor una resistencia algo mayor que la isoenzima hepática, posiblemente debido a que la enzima hepatobiliar al derivar de la isoenzima hepática por adición de un grupo fosfatidilcolina a su molécula, alcance una estructura más estable (KAPLAN, 1972) (CHEN, 1976).

La fosfatasa alcalina placentaria se distingue de las otras fracciones por su alta estabilidad al calor, su actividad no cambia después de 30 minutos a 70°C (NEALE y col., 1965). El suero de la embarazada en el último trimestre posee una gran resistencia al calor, por lo cual, su fosfatasa se considera casi íntegramente de origen placentario (MCMASTER y col., 1964) (CHIANDUSI y col., 1962) (LATNER, 1965). A las mismas conclusiones se ha llegado aplicando técnicas inmunológicas (BIRKEC y col., 1966). El suero del feto no contiene fosfatasas alcalinas estables al calor, de lo que se infiere que su actividad fosfatásica no tiene un origen placentario (KITCHENER y col., 1965).

La estabilidad al calor de la fosfatasa placentaria ha sido aprovechada para seguir el curso de la función placentaria. Así, un fallo materno fetal en el último trimestre de una gestación da lugar a una baja actividad fosfatásica placentaria en el suero, lo cual, se encuentra de acuerdo con el estriol urinario (MESSER, 1967) (CURZEN y MORRIS, 1968).

La determinación de la vida media de la fosfatasa alcalina placentaria puede efectuarse mediante un método basado en su estabilidad térmica, ensayando su aclaramiento tras ser inyectada intravenosamente en sujetos normales. Se ha encontrado que en la circulación sanguínea la duración de la isoenzima placentaria sigue una ecuación multifásica exponencial parecida al aclara-

miento de las proteínas sanguíneas inyectadas (CLUBB y col., 1965).

La estabilidad al calor de las isoenzimas Regan y Nagao es alta y similar a la placentaria (FISHMAN, 1968) (NAKAYAMA y col., 1970) (CHEN, 1976) (KAZUMASA, 1977). Igual estabilidad al calor la tienen la fosfatasa de sujetos con cáncer broncogénico y metástasis secundarias en las cápsulas suprarrenales, bazo, riñón y cerebro; se aparta de este comportamiento el cáncer de hígado y hueso.

1.1.2.2. Urea

La inactivación de los homogenados de tejidos ricos en fosfatasa por tratamiento con urea ha sido extensamente estudiado (BUTTERWORTH y MOSS, 1967) (BAHR y WILKINSON, 1967) (BIRKETT y col., 1967) (MOSS, 1970) (FERNLEY, 1971) (ESBRIT y col., 1975) (CHEN, 1976).

Se ha observado que los homogenados de hígado y los sueros de enfermos con lesiones hepáticas tratados con urea a baja concentración se produce una activación de la enzima, mientras que con concentraciones de urea más altas tienen lugar una inactivación, dependiendo ésta del tiempo de incubación, pH y de la temperatura (WILKINSON, 1970).

Las fosfatasas más resistentes al tratamiento con urea son la intestinal y la placentaria, mientras que las fosfatasas renal, hepática y ósea son más sensibles a dicha sustancia (WILKINSON, 1970).

La fosfatasa placentaria a 37°C tiene una vida media de

3 horas en urea 8 M, mientras que la enzima ósea en urea 3 M tiene una vida media de solamente 7 minutos, y la intestinal tiene una vida media intermedia (FERNLEY, 1971).

Para la determinación de los órganos de procedencia de la fosfatasa alcalina en el laboratorio resultan mucho más fáciles los ensayos basados en el calor que los correspondientes con soluciones de urea. Este último procedimiento no presenta ventajas y las conclusiones a que se llega son análogas a las obtenidas mediante calor (CHEN, 1976).

1.1.2.3. Iones y agentes quelantes

La fosfatasa alcalina reacciona de forma variada al adicionarle metales divalentes. Se observa una activación de la enzima al adicionarle los iones Co, Mg y Mn (MORTON, 1955) (PORTMAN, 1957) (AHMEN y KING, 1960) (FERNLEY, 1971). El EDTA, como complejante de éstos metales, actúa como un inactivador de la enzima (AIDA y SOTO, 1972).

No todos los iones metálicos producen la misma variación de la actividad o igual concentración de los iones adicionados, así los iones Be y Zn originan inhibiciones significativas mientras que los iones Ca, Ni y Cd tienen un efecto inhibitorio más débil que los anteriores (FERNLEY, 1971).

Las fosfatasas ósea y hepática son inhibidas, aproximadamente el 70%, con el ión $\text{Ni } 10^{-2} \text{ M}$, (AIDA y SOTO, 1972). La inhibición producida por el ión Zn es independiente del origen de las fosfatasas (AIDA y SOTO, 1972). En presencia de glicina no se ha observado inhibición por el ión Zn (HARKNESS, 1968) (FERNLEY, 1971). La inhibición obtenida con el ión Be está en íntima

dependencia de los sustratos (FERNLEY, 1971). La inhibición por los iones Be y Zn es reversible por adición del ión Mg (MORTON, 1955). La cinética de inhibición por el ión Zn se desconoce, puede ser una inhibición no competitiva o bien una mezcla de competitiva y no competitiva (FERNLEY, 1971).

Ha sido estudiada la cinética por adición del ión Mg (MORTON, 1955) (FERNLEY, 1971). La reacción de la fosfatasa por el ión Mg, presenta una activación constante hasta llegar a la concentración de 500 μ M. El ión Mg no presenta ninguna afinidad con el sustrato, sin embargo, produce efectos diferentes según el pH del mismo. En observaciones posteriores, se ha comprobado que la inhibición de la fosfatasa placentaria por la L-fenil-alanina se recupera su actividad, por la adición del ión Mg, el cual, incrementa en forma notable el número de centros activos, (FERNLEY, 1971). Aparte de ésta acción, hay que considerar la hipótesis de que el ión Mg, facilite la redistribución del ión Zn de los centros activos de la enzima (FERNLEY, 1971).

Los agentes quelantes como el EDTA, 8-hidroxiquinolina, orto-fenantrolina, a-a'dipiridil, etc., se comportan como fuertes inhibidores. La actuación del EDTA se produce al ser complejado el metal, aunque la reacción puede ser reversible con aumento de las concentraciones de Zn (PLOCKE y col., 1962).

1.1.2.4. pH

A la temperatura ambiente, la fosfatasa alcalina es generalmente muy estable en solución neutra o ligeramente alcalina, pero en cambio, es muy poco estable en medios ácidos con la consiguiente pérdida de actividad (FERNLEY, 1971). Así, un pH 3,5 durante 20 minutos a 0°C, causa casi la completa inactivación de

la enzima o sea, mientras que la enzima hepática, en las mismas condiciones, presenta una actividad residual del 50% (WILKINSON, 1970). Cuando la fosfatasa alcalina se incubaba a pH 3,3 o por debajo de él la inactivación es casi total, siendo la reactivación a pH 7 muy pequeña. La fosfatasa placentaria, después del tratamiento a pH 2,3 y 4°C, queda completamente inactivada (SUSSMAN y GOTTLIEB, 1969) (FERNLEY, 1971).

El tratamiento prolongado con ácidos produce en la enzima cambios conformacionales en la estructura de la proteína (SUSSMAN y GOTTLIEB, 1969) (WILKINSON, 1970) (FERNLEY, 1971).

1.1.3. Inhibidores y activadores

Existe numerosa literatura sobre inhibidores y activadores de la fosfatasa alcalina con el propósito de dilucidar que tejidos la producen y su diferenciación.

Los primeros estudios de inhibición por cianuro fueron realizados en animales (CLOETENS, 1939) (DRILL y RIGGS, 1946). La inhibición por cianuro también ha sido realizada en la fosfatasa intestinal humana; se trata de una inhibición de tipo competitivo (SCHMIDT y THANHAUSER, 1943).

El primer inhibidor estudiado de la fosfatasa ósea fueron las sales biliares. Se observó que éstas sales no inhibían las fosfatasas intestinal ni la placentaria (BODANSKY, 1937) (FISHMAN, 1967).

Los aminoácidos se consideran como inhibidores específicos de órgano (CHEN, 1976). La fosfatasa alcalina intestinal es inhibida por la L-fenil-alanina, pero no por la D-fenil-alanina.

(FISHMAN y col., 1963) (POSEN y col., 1967) (GHOSH y FISHMAN, 1968) (NAGODE y col., 1969) (FERNLEY y WALKER, 1970) (USATEGUI GOMEZ, 1974) (CHEN, 1976) (LILLIAM, 1976) (KAZUMASA y col., 1977). La isoenzima placentaria es inhibida por la 1-fenil-alanina (FISHMAN y GHOSH, 1967), por el L-triptófano (LIN y col., 1971), y por 1-leucina (NAKAYAMA y col., 1970) (LILLIAM, 1976). La fosfatasa alcalina ósea y hepática son inhibidas por los siguientes aminoácidos: L-homoarginina (KELLEN y LUSTING, 1971) (LILLIAM, 1976), por el imidazol (BRUNEL y CATHALA, 1972) y por el levamisol (BELLE y VAN, 1972), la L-histidina produce un desplazamiento en general del pH óptimo de la actividad enzimática (BODANSKY, 1948) (FISHMAN y col., 1963) (BODANSKY y SCHWARTZ, 1963). Todas éstas inhibiciones son de tipo no competitivo y estereoespecífico (FISHMAN, 1974).

La estabilidad a la temperatura de las fosfatasas séricas y en homogenados se utiliza frecuentemente en el laboratorio para conocer la procedencia de las isoenzimas. Este tratamiento es de gran importancia en el caso de las isoenzimas hepáticas y óseas, las cuales tienen una movilidad electroforética muy parecida en el gel. El procedimiento para diferenciarlas consiste en calentar el suero a 55°C, en sueros procedentes de sujetos con enfermedades óseas y hepáticas y determinar la vida media de la fosfatasa alcalina; éstas son de 112 segundos para la ósea y 456 segundos para la hepática (MOSS, 1976). Otro enfoque es considerar la inactivación total a la temperatura anteriormente indicada, produciéndose para la isoenzima ósea en 5 a 6 minutos, de 30 a 40 minutos la hepática y alrededor de 60 minutos la intestinal, quedando sin afectar la placentaria (MOSS, 1970).

La inhibición por la urea fué estudiada por Birket y col. en 1967, según estos autores, las recuperaciones en tantos por

ciento de actividad residual para las diferentes isoenzimas es de 74, 52, 38 y 17, para los siguientes grupos estudiados, suero de embarazada, suero de enfermos hepáticos, suero de sujetos normales, suero de enfermos con enfermedades óseas. El experimento lo hacía previa incubación de 14 minutos en 3 M de urea.

En homogenados, la fosfatasa intestinal es más resistente a la acción de la urea que la fosfatasa renal (BUTTERWORTH y MOSS, 1967).

Un potente inhibidor de las fosfatasas son las sales de EDTA que a concentraciones de 10/mM inhibe las isoenzimas hepática, ósea, renal, intestinal, solo es resistente a este tratamiento la isoenzima placentaria (WILKINSON, 1970).

Entre los activadores se encuentra la urea, que a concentraciones de 0,5 M presenta marcada activación en los extractos hepáticos y ocasionalmente en los sueros procedentes de enfermos hepáticos (WILKINSON, 1970). El ión Mg es un activador de la fosfatasa alcalina pero su acción difiere de la procedencia de la enzima (FISHMAN, 1967). Los aminoácidos a altas concentraciones presentan activaciones de la enzima (AKAMATSU y KOBAYASHI, 1951) (BODANSKY, 1949). Muchos productos aceptores de fosfatos se comportan como activadores, en virtud de eliminar el ión fosfato impidiendo la reacción inversa (FISHMAN, 1967).

1.1.4. Estudio cinético y mecanismo de la acción enzimática

Hay una considerable literatura respecto a estudios cinéticos (CLOETENS, 1939) (PORTMANN, 1957) (BINKLEY, 1961) (LAZDUNSKI y OULLET, 1961) (SARASWATHI y BACHBAWAT, 1963) (ARION y NORD-

LIE, 1964) (JENKINS y D'ARI, 1966) (SARASWATHI y BACHDAWAT, 1966) (WOLF y col., 1969) (FERNLEY, 1971) (BERGERMAN y BLETHEN, 1972) (EWEN, 1974) (KAZUMASA y col., 1977) (OTANS y col., 1978).

1.1.4.1. Especificidad de sustratos y constatación de MICHAELIS

La fosfatasa alcalina pertenece a un grupo de enzimas que presentan una baja especificidad respecto al sustrato.

Roche y Searles (1951) sugieren que la actividad de cada una de las fosfatasas por los sustratos puede servir para indicar la procedencia de las mismas.

Cada una de las fosfatasas humanas tiene cierta preferencia por un determinado sustrato. Así, la fosfatasa intestinal hidroliza el O-carboxifenilfosfato más rápidamente que otros sustratos (FISHMAN y col., 1962), la fosfatasa alcalina placentaria es más activa para el p-nitrofenilfosfato (SADOVSKI y ZUCKERMAN, 1965), la fosfatasa hepática hidroliza preferentemente a la etanol amina fosfato (FISHMAN, 1962).

La velocidad de hidrólisis difiere con los sustratos, es relativamente rápida con los ésteres de los fosfatos y más lenta con ésteres de pirofosfatos y fosfatos de nucleótidos (FISHMAN y GHOSH, 1967) (CHEN, 1976).

CONSTANTES DE MICHAELIS DE LAS FOSFATASAS ALCALINAS

Sustrato	pH	Muestra	Buffer	Conc.	T.°C	Km / M ⁻¹	Autor
Fenilfosfato	9,3	Intestino	Carb-Bicarb	0,05 M	37	160	1
Fenilfosfato	10,0	Intestino	Carb-Bicarb	0,05 M	37	2.100	2
B-glicerofos.	10,0	Intestino	Carb-Bicarb	0,05 M	37	1.200	2
a-naftilfos.	9,8	Intestino	Carb-Bicarb	0,05 M	37	630	1
B-naftilfos.	10,1	Intestino	Carb-Bicarb	0,1 M	37	90	3
Timolfta-fos.	10,0	Intestino	2,amino,met.	0,05 M	37	1.380	11
B-naftilfos.	10,1	Hígado	Carb-Bicarb	0,1 M	37	67	3
Timolfta-fos.	10,0	Hígado	amin-met-pro.	0,05 M	37	1.310	11
B-naftilfos.	10,1	Hueso	Carb-Bicarb	0,1 M	37	103	3
Timolfta-fos.	10,0	Hueso	amin-met-pro.	0,05 M	37	1.080	11
B-naftilfos.	10,2	Riñón	Carb-Bicarb	0,1 M	37	104	3
Fenilfosfato	10,0	Riñón	Carb-Bicarb	0,1 M	37	5.700	2
B-glicerofos.	10,0	Riñón	Carb-Bicarb	0,1 M	37	25.000	2
Piridoxal-fos.	9,0	Cerebro	Tris-acetato	0,1 M	37	430	4
p,nitro, fen, fos.	9,0	Cerebro	Tris-acetato	0,1 M	37	1.250	4
5,AMP.	9,0	Cerebro	Tris-acetato	0,1 M	37	575	4
Fenilfosfato	8,9	Placenta	Carb-Bicarb	0,05 M	37	316	1
Fenilfosfato	9,1	Placenta	Carb-Bicarb	0,05 M	37	313	1
Fenilfosfato	9,3	Placenta	Carb-Bicarb	0,05 M	37	370	1
Fenilfosfato	9,5	Placenta	Carb-Bicarb	0,05 M	37	590	1
Fenilfosfato	9,7	Placenta	Carb-Bicarb	0,05 M	37	1.100	1
Fenilfosfato	9,8	Placenta	Carb-Bicarb	0,05 M	37	1.145	1
Fenilfosfato	9,9	Placenta	Carb-Bicarb	0,05 M	37	1.100	1
Fenilfosfato	10,0	Placenta	Carb-Bicarb	0,05 M	37	1.890	1
Fenilfosfato	10,1	Placenta	Carb-Bicarb	0,05 M	37	2.000	1
Fenilfosfato	10,3	Placenta	Carb-Bicarb	0,05 M	37	5.000	1
Fenilfosfato	10,5	Placenta	Carb-Bicarb	0,05 M	37	5.000	1
B-glicerofosfa.	10,2	Placenta	Etanolamina	0,1 M	38	1.000	5
Fenilfosfato	10,0	Placenta	Etanolamina	0,1 M	37	1.200	2
B-glicerofosfa.	10,0	Placenta	Etanolamina	0,1 M	37	1.800	2
5,AMP	10,5	Placenta	Glicina	0,1 M	30	3.000	8,9
ADP	10,5	Placenta	Glicina	0,1 M	30	4.400	8,9
ATP	10,5	Placenta	Glicina	0,1 M	30	5.700	8,9

CONSTANTES DE MICHAELIS DE LAS FOSFATASAS ALCALINAS (continuación)

Sustrato	pH	Muestra	Buffer	Conc.	T. °C	Km / M ⁻¹	Autor
Glucosa, 1, fos.	10,5	Placenta	Glicina	0,1 M	30	4.800	8,9
B-glicerofos.	10,5	Placenta	Glicina	0,1 M	30	1.400	8,9
Fosfoetanolamina	10,5	Placenta	Glicina	0,1 M	30	2.900	8,9
p,nitro, fenil, fos	10,5	Placenta	Glicina	0,1 M	30	800	8,9
Timolfta-fos.	10,0	Placenta	amin, met, pro.	0,05 M	37	1.380	11
p, metil, fenil, fos	10,0	Suero	Carb-Bicarb.	0,05 M	35	955	7
m, metil, fenil, fos	10,0	Suero	Carb-Bicarb.	0,05 M	35	765	7
fenilfosfato	9,8	Suero	Carb-Bicarb.	0,05 M	35	645	7
m, metoxifenil, fos	9,8	Suero	Carb-Bicarb.	0,05 M	35	370	6
Fenilfosfato	9,5	Suero	Veronal	0,04 M	25	350	6
B-naftilfosfato	10,0	S. Paget	Carb-Bicarb.	0,05 M	30	110	10,12
B-naftilfosfato	10,0	S.Ca. mama	Carb-Bicarb.	0,05 M	30	110	10,12
B-naftilfosfato	10,0	S.Ca. pancr.	Carb-Bicarb.	0,05 M	30	94	10,12
B-naftilfosfato	10,0	S.Ca. pancr.2	Carb-Bicarb.	0,05 M	30	67	10,12
B-naftilfosfato	10,0	Cirros.bil.	Carb-Bicarb.	0,05 M	30	71	10,12
B-naftilfosfato	10,0	Linfosarcoma	Carb-Bicarb.	0,05 M	30	81	10,12

- 1 (FISHMAN y GHOSH, 1967)
- 2 (AHMED y KING, 1960)
- 3 (MOSS y KING, 1962)
- 4 (SARASWATHI y BACCHAWAT, 1963)
- 5 (ANAGNOSTOPOULOS y MATSUDAIRA, 1958)
- 6 (NATH y GHOSH, 1963)
- 7 (NATH y GHOSH, 1963)
- 8 (HARKNESS, 1968)
- 9 (FERNLEY, 1971)
- 10 (MOSS y KING, 1961 b)
- 11 (COMPTON y col., 1974)
- 12 (WILKINSON, 1970)

1.1.4.2. Influencia entre pH y sustratos

Ha sido observado un pH óptimo para las diferentes fosfatasa alcalinas.

El pH óptimo está afectado por el tipo y concentración del sustrato y buffer (CHEN, 1976). Hay una relación directa, logarítmica, entre el pH óptimo y la concentración del sustrato (ROSS y col., 1951) (CHEN, 1976).

En los purificados de fosfatasa alcalina placentaria el pH óptimo es de 10,6, con sustrato fenilfosfato 18/mM y buffer carbonato-bicarbonato pH 10,0 (FISHMAN y GHOSH, 1967). En los purificados de fosfatasa placentaria, el pH óptimo es de 10,7 con sustrato p-nitrofenilfosfato (USATEGUI-GOMEZ, 1974). Para esta misma fosfatasa con buffer 2,amino,1,metil,propanol y sustrato de timolftaleinaminosfosfato, su pH óptimo se encuentra a 10,2 (COMPTON y col., 1974).

La naturaleza de los sustratos y sus concentraciones respectivas es de suma importancia. Así, el b-glicerofosfato se hidroliza más lentamente que el fenilfosfato por la fosfatasa intestinal y placentaria (FISHMAN y GHOSH, 1967), ambas fosfatasa presentan una baja actividad en relación con los sustratos antes mencionados a un pH de 8,8 y a partir de este pH la actividad aumenta considerablemente al ir aumentando éste (FISHMAN y col., 1967).

La concentración de sustratos y los pH están relacionados con los pK_m , el punto de inflexión observado en el pK_m con respecto a pH, para la fosfatasa intestinal, con sustrato fenilfosfato y pH de 8,6 se atribuye a grupos disociables del enzima libre y a pH 9,6 a grupos disociables del complejo E-S (GHOSH y

FISHMAN, 1966) (FISHMAN y GHOSH, 1967). Para la fosfatasa placentaria el pK_m era de 9,3 y 9,9 en el enzima libre y cambiaba a 9,7 y 10,3 respectivamente en el complejo E-S.

Asimismo, la velocidad máxima y la constante de Michaelis dependen del pH (GHOSH y FISHMAN, 1966).

La composición de los bufferes debe ser tenida en cuenta (BRESTKIN y RZHEKHINA, 1965) (GHOSH y FISHMAN, 1966). Así, el buffer veronal sufre una descomposición apreciable a 37°C durante una hora de incubación; empieza a un pH de 9,8 y termina a un pH de 9,3 (KING y ARMSTRONG, 1934) (KING y DELORY, 1940). Los bufferes de 2,amino,2,metil,1,3,propanodiol y el hidroximetilaminometano, son sustancias aceptoras de grupos fosforil y por consiguiente a medida que pasa el tiempo aumenta la descomposición del sustrato (DAYAN y WILSON, 1964).

Debe tenerse muy en cuenta que la composición y concentración de bufferes y sustratos deben ser idénticos, de lo contrario, los resultados no son comparables en las determinaciones enzimáticas (FISHMAN y GHOSH, 1967).

Muestra	Sustrato	Conc. sustr. mM	Buffer	pH óptimo	Autor
Intestino	fenilfosfato	18	Carb-Bicarb.	9,9	1
Intestino	a-naftilfosfato	55	Carb-Bicarb.	9,8	1
Intestino	B-naftilfosfato	5	Carb-Bicarb.	10,1	2
Intestino	Timolftaleinafos.	5	Amino,met,pro.	9,8	3
Placenta	Fenilfosfato	18	Carb-Bicarb.	10,6	4
Placenta	Fenilfosfato	72	Carb-Bicarb.	10,7	1
Placenta	B-glicerofosfato	1	Etanolamina	10,2	5
Placenta	Fenilfosfato	1	Etanolamina	10,2	5
Placenta	Fenilfosfato	2,5	Carb-Bicarb.	10,3	6
Placenta	Fenilfosfato	5	Etanolamina	10,2	6
Placenta	Fenilfosfato	5	Veronal	9,9	6
Placenta	Fenilfosfato	5	Glicina	9,6	6
Placenta	B-glicerofosfato	5	Etanolamina	9,7	6
Placenta	B-glicerofosfato	5	Veronal	9,9	6
Placenta	B-glicerofosfato	5	Glicina	9,6	6
Placenta	Timolfta.fosfato	5	Amino,met,pro.	10,2	3
Placenta	p-nitro, fenil, fos.	18	Amino,met,pro.	10,7	7
Placenta	Fenilfosfato	18	Carb-Bicarb.	10,6	8
Hígado	B-naftilfosfato	5	Carb-Bicarb.	10,1	2
Hígado	Timolfta.fosfato	5	Amino,met,pro.	9,8	3
Hueso	B-naftilfosfato	5	Carb-Bicarb.	10,1	2
Hueso	Timolfta.fosfato	5	Amino,met,pro.	9,8	3

Muestra	Sustrato	Conc. sustr. mM	Buffer	pH Óptimo	Autor
Riñón	B-naftilfosfato	5	Carb-Bicarb.	10,2	2
Cerebro	Piridoxalfosfato	0,33	Tris- Acetato	9,0	9
Orina	Fenilfosfato	5	Carb-Bicarb.	10,1	10
Suero	Fenilfosfato	4	Veronal	9,5	11
Suero	Fenilfosfato	4	Carb-Bicarb.	9,8	12
Suero	B-glicerofosfato	20	Veronal	9,3	13
Suero	p-metil, fenil, fos.	4	Carb-Bicarb.	10,0	12
Suero	m-metoxifenilfos.	4	Carb-Bicarb.	9,8	12
Suero	Timolfta. fosfato	5	Amino, met, pro.	10,1	3

- 1 (FISHMAN y GHOSH, 1967)
- 2 (MOSS y KING, 1962)
- 3 (COMPTON y col., 1974)
- 4 (GHOSH y col., 1966)
- 5 (ANAGNOSTOPOULOS y MATSUDAIRA, 1958)
- 6 (AHMED y KING, 1960)
- 7 (USATEGUI-GOMEZ y col., 1974)
- 8 (FISHMAN y col., 1967)
- 9 (SARASWATHI y BACHAWAT, 1963)
- 10 (BUTTERWORTH y col., 1965)
- 11 (KING y ARMSTRONG, 1934)
- 12 (NATH y GHOSH, 1963)
- 13 (NATH y GHOSH, 1966; BODANSKY, 1932; BODANSKY, 1933; SHINOWARA y col., 1942; KEAY y TREW, 1964)

1.1.5. Grupos esenciales en los centros activos de la enzima

En los centros activos de la fosfatasa alcalina, al igual que cualquier otra enzima, existen agrupaciones atómicas necesarias para efectuar la actividad catalítica específica. Estas agrupaciones tienen una determinada secuencia de aminoácidos en la cadena peptídica la cual presenta una geometría y una densidad electrónica adecuada para la función catalítica.

Hay discrepancia entre los autores sobre la asignación de grupos esenciales en los centros activos de la fosfatasa alcalina.

El grupo ϵ -NH₂ de la lisina es aceptado como importante para el mecanismo enzimático (COHN y EDSALL, 1943) (GOULD, 1944) (ANAGNOSTOPOULOS, 1950) (LAZDUNSKY y OULLET, 1962) (FISHMAN y GHOSH, 1967) (CHEN, 1976). La misión de este grupo es unirse con el sustrato (FISHMAN y GHOSH, 1967). La intervención del grupo ϵ -NH₂ se pone de manifiesto, en el proceso enzimático, por el tratamiento específico con orto-metil-iso-urea que origina una inhibición (COHN y EDSALL, 1943) (FRAENKEL y col., 1948) (FRAENKEL, 1957) (GHOSH y FISHMAN, 1966) (FISHMAN y GHOSH, 1967).

El grupo -SH de la cisteína tiene por misión unirse al metal y por ello es fundamental en el mecanismo de la catálisis (MATHIES, 1958) (VALLEE, 1960) (LAZDUNSKI y OULLET, 1962) (PLOCKE y col., 1962) (AGUS y col., 1966) (FERNLEY, 1971) (CHEN, 1976). Dicho grupo se inactiva por varios reactivos específicos tales como p-hidroximercurio-benceno, yodo-acetamida, yodo, etc., que alteran la geometría de los centros activos de la enzima (BARRON y SINGER, 1945). La presencia del sustrato puede proteger a la enzima de la inactivación, produciendo una acción re-

versible (FISHMAN y GHOSH, 1967).

Para algunos autores, el grupo OH^- de la serina, es considerado como muy importante (ENGSTRON, 1964) (SCHWARTZ y col., 1963). La misión de este grupo esencial es formar un intermedio con el fosfato del sustrato, en el mecanismo de la reacción enzimática. Ha sido posible formar una enzima fosforilada marcando con P 32 en la serina. No obstante, la importancia de este grupo esencial es muy discutido por otros autores, (ENGSTRON, 1961) (BUICE y col., 1962) (MILSTEIN, 1964) (SHWARTZ, 1963) (SCHWARTZ y col., 1963) (ENGSTRON, 1964) (WILSON y DAYAN, 1964) (ZUCKERMAN y SADOVSKI, 1965) (WILSON y DAYAN, 1965) (PIGRETTI y MILSTEIN, 1965) (FISHMAN y GHOSH, 1967).

El grupo hidroxilo de la tirosina también ha sido objeto de discusión como grupo esencial (SIZER, 1942) (MORTON, 1957). La inactivación de la enzima por el yodo ha sido atribuida al grupo hidroxifenol de la tirosina y por otra parte la interpretación de las curvas $\text{pKm} - \text{pH}$ parecen indicar esa agrupación como importante. Para otros autores (FISHMAN y GHOSH, 1967), la inactivación se debe a que el grupo $-\text{SH}$ de la cisteína. En revisiones posteriores (CHEN, 1976) este agrupamiento no se tiene en cuenta.

1.1.6. Mecanismo de catálisis de la fosfatasa alcalina

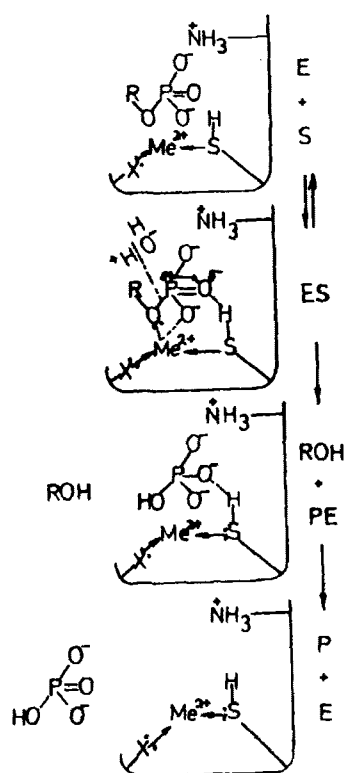
El mecanismo de catálisis de la fosfatasa alcalina, caso particular de las fosfohidrolasas (fosfatasas ácidas de las plantas, β -D-glucosidasa, α -D-glucosidasa, quimiotripsina, aldehído deshidrogenasa, etc.) ha sido objeto de estudio por numerosos autores (NATH y RYDON, 1954) (HALL y col., 1962) (BENDER y

NAKAMARA, 1962) (CAPLOW y JECNKES, 1962) (DEITRICH y col., 1962) (PONTREMOLI y col., 1965) (KRESS y col., 1966) (FISHMAN y GHOSH, 1967) (ESBRIT, 1975) (CHEN, 1976) (KAZUMASA, 1977).

Los trabajos recientes confirman las teorías de que el grado de hidrólisis, por la enzima, depende de la densidad electrónica en la parte atacada de la molécula del sustrato (HAMMET, 1940) (FISHMAN y GHOSH, 1967) (NATH y GHOSH, 1963), y que en la fracción del complejo E.S. hay interacción electrostática con puntos de unión entre sustrato y enzima con cambios configuracionales de éstas (LAZDUSKY y OULLET, 1961) (NATH y GHOSH, 1963) (LAZDUNSKY y col., 1965) (FISHMAN y GHOSH, 1967) (FERNLEY, 1971).

En la actualidad se acepta que el mecanismo de catálisis es como sigue: Durante la formación del complejo enzima - sustrato, un electrón correspondiente al oxígeno del éster fosfato es atraído hacia la carga positiva del grupo $-NH_3^+$ de la lisina. Otro oxígeno del fosfato correspondiente al sustrato, forma puente de unión con los H del grupo $-SH$ de la cisteína. El grupo activo del metal se une al átomo de oxígeno del fósforo del sustrato. Inmediatamente el fosfato es separado del complejo enzima - sustrato formando un intermediario enzima - fosforilado.

El mecanismo de la formación del complejo ES esquematizado a continuación se debe a los trabajos de investigación por diversos autores (COHN, 1949) (STEIN y KOSHLAND, 1952) (CUNNINGHAM, 1957) (KLOTZ, 1954) (MATHIES, 1958) (VALLEE, 1960) (PORTMANN y col., 1960) (ENGSTRON, 1961) (PLOCKE y col., 1962) (SCHWARTZ, 1963) (NATH y GHOSH, 1963) (ENGSTRON, 1964) (MALAMY y HORECKER, 1964) (SCHLESINGER y BARRETT, 1965) (DABICH y NEUHAS, 1966) (HSU y col., 1966) (FISHMAN y GHOSH, 1967) (FERNLEY, 1971) (CHAPPELET TORDO y col., 1974) (CHEN, 1976).



Según este mecanismo la excisión ocurre entre los átomos de O y P como se muestra en la segunda figura, dando lugar a la transferencia de un grupo fosforilo.

Es obvio que se han propuesto otros mecanismos de reacción pero el más aceptado por los autores es el que se ha expuesto anteriormente.

2. ISOENZIMAS DE LA FOSFATASA ALCALINA

=====

2. ISOENZIMAS DE LA FOSFATASA ALCALINA =====

2.1. GENERALIDADES

El nombre de isoenzimas fué propuesto por Market y Moller (1959) que las definió como distintas formas moleculares de una enzima dada. Posteriormente, el mismo autor añadió que son proteínas con diferentes formas moleculares pero presentan todas ellas la misma especificidad enzimática (MARKET, 1961; MARKET y APELLA, 1961; MARKET y URSPRUNG, 1962; MARKET, 1963; MARKET, 1964).

Esta primera definición ha sido completada por diversos autores, entre los que se pueden señalar:

- Son enzimas que se presentan en varias formas, las cuales, diffieren electroforéticamente, capacidad catalítica, termolabilidad, composición de aminoácidos y propiedades inmunológicas (CANTAROW y SCHERARTZ, 1969).
- Las isoenzimas son enzimas que poseen funciones idénticas, especificidad similar de sustrato, capacidad de catalizar la misma reacción y que presentan diferencias en cuanto a sus propiedades físicas, químicas o serológicas. Pueden ser estudiadas por aplicación de las técnicas actuales de aislamiento y purificación de proteínas, especialmente la migración electroforética (BISERTE, 1970).
- Las isoenzimas son múltiples formas moleculares de enzimas derivadas del mismo organismo o cultivo de tejido, que tienen al menos un sustrato común (ESBRIT y col., 1975).
- Se consideran isoenzimas aquellas fracciones de una enzima, se

- parables por electroforesis u otros medios, que tienen especificidad enzimática análoga y que en su formación interviene un control genético. Si esta última condición no se cumple solo se puede decir que son formas moleculares de la enzima (CARRERAS, 1978).

Un aspecto de interés general es el origen de las enzimas respecto al órgano de procedencia. Algunos autores (WIELAND y PFLEIDERER, 1962) restringen el término isoenzima y denominan heteroenzimas a las enzimas con acción catalítica semejante procedentes de distintos órganos o tejidos. Sin embargo, está muy extendida la idea de llamar isoenzimas en su sentido más amplio.

En la fosfatasa alcalina, como en otras enzimas, se ha intentado la separación de sus isoenzimas así como la localización de la procedencia de cada una de ellas en los distintos órganos. Se han aplicado las técnicas de cada momento en uso en la separación, aislamiento y descripción de las isoenzimas. Se han utilizado principalmente los métodos electroforéticos para la separación, procedimientos de inhibición y estabilidad frente a agentes físicos y químicos, para la identificación de las fracciones obtenidas juntamente con la información procedente del estudio de los espectros electroforéticos de sueros de individuos con alteraciones patológicas. Los resultados obtenidos por los diversos autores son generalmente poco concordantes y por ello, quizás, sea válida, para la fosfatasa alcalina, la idea de que cada familia de isoenzimas se presenta en múltiples formas moleculares dando lugar a un número variable de bandas y que cada familia se puede diferenciar, unas de otras, por criterios bioquímicos, físicos o inmunológicos (CHEN, 1976).

Como en otras enzimas el conocimiento de las isoenzimas de la fosfatasa alcalina y la procedencia de las mismas presen-

ta interés en clínica como ayuda en el diagnóstico.

2.2. PROCEDIMIENTOS PARA LA SEPARACION DE ISOENZIMAS

Las enzimas, por tratarse de proteínas, pueden separarse en sus isoenzimas por los procedimientos generales de aislamiento y purificación de proteínas con la condición de que en la manipulación no se afecten los centros catalíticos. Para fines de aplicación a la clínica no es preciso que se llegue a la individualización de las isoenzimas, es suficiente con técnicas que de terminen la actividad enzimática de cada una de ellas y puedan ser referidas en forma porcentual. Se pueden clasificar los métodos de separación de isoenzimas en dos grandes grupos:

- a) Métodos electroforéticos
- b) Otros métodos de separación

En el primer grupo, los procedimientos aplicados a la evaluación de las isoenzimas de la fosfatasa alcalina han seguido la evolución de la metodología electroforética. Así, la separación se inició con la electroforesis en papel y seguidamente se intentó con otras modalidades electroforéticas según fueron desarrollándose y alcanzándose diversos logros. En la actualidad la técnica basada en el gel de poliacrilamida por su poder resolutivo y otras ventajas goza de grandes preferencias.

El otro grupo de métodos de separación está formado por diversas técnicas en las que la electroforesis no es esencial, comprende, entre otras, la separación en columnas de Shephadex, electroisofocusing, cromatografía de intercambio iónico, radioinmunoensayo, etc.

Con los procedimientos utilizados en la actualidad ha sido posible la separación y purificación de la fosfatasa alcalina placentaria (AHMED y col., 1959, 1960) (GHOSH y col., 1966) (MOSS y col., 1966), llegándose a obtener dos variantes, la A y la B, las cuales, constituyen entidades con características definidas, según algunos autores, puestas de manifiesto por sus constantes, tales como actividad enzimática, peso molecular, constante de sedimentación, etc. La variante B de la isoenzima placentaria parece estar formada por varios agregados unitarios de la variante A, ya que después de un tratamiento adecuado puede ser convertida en la variante B.

Hasta la fecha, no se ha encontrado bibliografía en la que se informe sobre el aislamiento y purificación de otras isoenzimas de la fosfatasa alcalina.

2.2.1. Métodos electroforéticos de separación de isoenzimas

2.2.1.1. Electroforesis en papel

El método de separación en papel solo tiene importancia histórica por haber permitido la evidencia de la heterogeneidad de la fosfatasa alcalina. Esta técnica, como en la separación de proteínas, ha sido superada por otros soportes.

En los primeros trabajos (BAKER y PELLEGRINO, 1954) se demostró mediante corte de la tira de papel e incubación en el sustrato alfa-naftilfosfato que la fosfatasa alcalina emigra principalmente asociada a la fracción α_2 -globulina. Estos hallazgos iniciales fueron confirmados en trabajos posteriores WOFSON,

1957; AHMED y KING, 1960).

Con la modificación en las condiciones operatorias y empleo de sueros pertenecientes a diversas enfermedades se puso de manifiesto con esta técnica que la fosfatasa alcalina se puede separar en fracciones que se sitúan entre la alfa-2 y la beta-globulinas (NATH y GHOSH, 1964; GHOSH y FISHMAN, 1966).

2.2.1.2. Electroforesis en gel de almidón

El almidón como soporte en electroforesis ha sido utilizado para la separación de proteínas en dos modalidades: a) En forma de bloque, utilizando almidón corriente, generalmente de patata, y b) Gel de almidón procedente del llamado almidón soluble.

Los primeros estudios en la separación de isoenzimas de la fosfatasa alcalina en almidón fueron realizados con la técnica conocida como en bloque de almidón, obteniéndose fracciones que se situaban entre la alfa-1 y la beta-globulina (ROSEMBER, 1959; KEIDIN, 1959; COOKE y SILVA, 1961) en cuatro bandas, cuyo número y posición dependían del suero ensayado.

El gel de almidón es un procedimiento valioso para la separación de isoenzimas desde que fué aplicado (SMITHIES, 1955) (BOYER, 1961; MOSS, 1963, 1965). Con este método se alcanza una buena resolución obteniéndose hasta seis bandas con actividad fosfatásica, las cuales, han sido denominadas por las letras A, B, C, D, E y F, por algunos autores.

Con esta técnica se ha intentado la identificación de las bandas mediante el tejido de procedencia o bien de mayor aportación fosfatásica (SCHLAMOWITZ y BODANSKY, 1959; HODSON y col.,

1962; KEIDING, 1966; WARNOCK, 1966; POPE, 1966)

2.2.1.3. Electroforesis en agarosa

En este procedimiento, basado en la electroforesis en un bloque de un gel de agarosa u otro tipo de agar en un buffer conveniente y con refrigeración, se separan pocas bandas de la fosfatasa alcalina.

Inicialmente, fué aplicada esta técnica por HAIJE y DE-DONG (1963) en sueros y homogenados encontrando una banda rápida situada en la alfa-2-globulina y otra en la alfa-1-globulina, ambas hepáticas y una tercera más lenta que correspondía a enfermos con afecciones oseas. Los resultados son muy semejantes a los hallados por otros autores en gel de almidón.

Esta técnica sigue teniendo cierta preferencia en la actualidad, en combinación con diferentes inhibidores, en los laboratorios clínicos por su simplicidad interpretativa (DYMLING, 1966; WILKINSON, 1970; SUNDBLAD, 1973; EWEN, 1974; STEPAN, 1976).

2.2.1.4. Electroforesis en acetato de celulosa

El soporte de acetato de celulosa tiene bastantes ventajas respecto al de celulosa en la electroforesis como pequeña adsorción de proteínas, eliminación de colas de la albúmina, etc. Por otra parte, el acetato de celulosa es una sustancia químicamente homogénea, que permite la posibilidad de hacerla transparente y con ello densitometrías de proteínas teñidas.

La electroforesis en acetato de celulosa resulta de gran

utilidad en el laboratorio clínico para la separación de proteínas y ha sido aplicado asimismo en la separación de isoenzimas en general y en la fosfatasa alcalina en particular (KORNER, 1962; KITCHENER y otros, 1965; MATAMOROS y BALCELLS GORINA, 1976; POSEN y col., 1967; BOTEY y col., 1975). Con esta técnica se obtienen buenos resultados; presenta una sensibilidad mayor que el método de la agarosa. El número de bandas obtenidas es pequeño.

En sueros normales, por contener pequeña cantidad de fosfatasa alcalina, no aparecen bandas con actividad fosfatásica a no ser que se efectúen varias aplicaciones. En sueros patológicos, solo aparece la banda cuya isoenzima es predominante.

2.2.1.5. Electroforesis en gel de acrilamida

El gel de acrilamida presenta unas características especiales como soporte en la electroforesis:

- Transparencia óptica. Permite el tñido de las proteínas separadas en forma de bandas y la densitometría de las mismas.
- Zona amplia de pH en el gel. Posibilidad de separaciones con relación al punto isoeléctrico.
- Flujo electroosmótico sin complicaciones.
- Preparación fácil de un determinado poro. Además de la separación por movilidad electroforética hay una separación por tamaño molecular.
- El tñido de las bandas queda permanente. El color obtenido no se difunde y es estable.

Las anteriores propiedades han dado lugar a que desde su

introducción (RAYMON, 1959; ORNSTEIN, 1959) como soporte en electroforesis haya sido ampliamente utilizado en la separación de proteínas y sobre todo de isoenzimas.

Como es sabido, el gel se prepara a partir de una mezcla constituida por el monómero, co-monómero (metilen-bis-acrilamida) y un catalizador. El tamaño de poro resulta de la proporción entre el monómero y el co-monómero. Cuando se prepara un gel con varias porosidades, entre estas fracciones no hay discontinuidades, lo cual, para la movilidad electroforética de las proteínas resulta ventajoso. En este procedimiento la electroforesis se realiza con los geles dentro de tubos de vidrio colocados verticalmente y las fracciones separadas aparecen como discos en el gel, de ahí el nombre de electroforesis en disco, así llamada también.

La técnica del gel de acrilamida para la separación de isoenzimas cada vez tiene más seguidores dadas sus ventajas indicadas anteriormente. Ha sido aplicada por varios autores (SMITH y LIGHTSTONE, 1968; KAPLAN y ROGERS, 1969; SMITH, 1970; LEE y KENNY, 1975; HEALY, 1974; DINGJAU, 1973; BURLINA y BLUGIARDINI, 1978; CROFTON y SMITH, 1978; SUBRAMONIAM, 1978).

2.2.2. Otros métodos de separación de isoenzimas

Dada la naturaleza proteica de las isoenzimas también pueden ser separadas e identificadas por otros procedimientos en los que la electroforesis no sea básica e incluso no intervenga.

Entre los procedimientos no exclusivamente electroforéticos que han sido aplicados a la fosfatasa alcalina se pueden mencionar:

- Electroforesis en gel de Sephadex
- Electroisofocusing
- Técnicas cromatográficas

Estas técnicas si bien tienen gran interés en investigación son de pequeña utilidad como ayuda en clínica por ser algo complicadas y poco rápidas.

Electroforesis en gel de Sephadex

Cuando el contenido en proteínas es bajo, 0.05-1.0 mg/ml, como en homogenados de tejidos, la técnica electroforética corriente presenta inconvenientes al ser aplicada para la separación de sus fracciones y para la purificación de las enzimas. La electroforesis en gel de Sephadex ha sido utilizada en estos casos. Para estos fines ha sido usado el Sephadex G 200 (FISHMAN y GHOSH, 1967; INGLIS y col., 1968; VAN BELLE, 1976).

Electroisofocusing

La técnica conocida como electroisofocusing es una variante de la electroforesis en donde una mezcla de anfólitos disueltos en un medio conveniente entre electrolitos de diferentes pH, se separan de acuerdo a sus puntos isoeléctricos. Fue descrita en primer lugar por DALE y LATNER (1968).

Con este método se obtienen muchas bandas de difícil identificación. Potencialmente es un procedimiento de utilidad en la separación de isoenzimas (USATEGUI-GOMEZ y TARBUTTON, 1974).

Técnicas cromatográficas

La cromatografía es un arma poderosa en la separación de

componentes en una mezcla. Se basa en la interacción o afinidad entre sustancias disueltas en movimiento (fase móvil) y un soporte (fase fija). El soporte puede tener características físico-químicas muy diversas y debe estar de acuerdo con las sustancias a separar. Por otra parte, existen variantes en la forma de efectuar la cromatografía.

En la separación de isoenzimas de la fosfatasa alcalina se han utilizado soportes de distinta naturaleza y propiedades, así se ha usado celulosas de cambio iónico, como la DEAE-celulosa (etilaminoetilcelulosa) en columna con la cual se han separado dos fracciones en homogenados de intestino humano (MOSS, 1965) y cuatro fracciones del riñón (BUTTERWORTH y MOSS, 1966).

También se han utilizado columnas de Sephadex G 200, tanto para la separación de isoenzimas como para la purificación de las mismas en tejidos y sueros (MOSS, 1963; VAN BELLE, 1976; USATEGUI-GOMEZ y TARBUTTON, 1974). Con esta técnica se ha demostrado que varias isoenzimas de la fosfatasa alcalina tienen un peso molecular semejante.

2.3. METODOS DE IDENTIFICACION DE LAS ISOENZIMAS

El principal problema en un estudio general de las isoenzimas, en un determinado organismo, es conocer las propiedades y características de cada una de las isoenzimas que componen un sistema enzimático dado. Una vez conocidas esas propiedades permite la identificación y dosificación de las mismas que unido al conocimiento de las fuentes de producción en los diversos órganos, puede ser de utilidad como ayuda en el diagnóstico clínico.

En la actualidad todavía no se conocen bien la constitu-

ción y propiedades de la mayoría de las enzimas o isoenzimas; su estudio ofrece grandes dificultades. Lo anterior es válido para las isoenzimas de la fosfatasa alcalina a pesar de los numerosos intentos que se han efectuado hasta la fecha.

La identificación de las isoenzimas de la fosfatasa alcalina ha sido orientada por diversos caminos, entre los que sobresalen

- Posición de las bandas en el gel u otro soporte
- Métodos basados en la estabilidad de la enzima
- Métodos con sustancias inhibidoras
- Tratamientos con neuroaminidasa
- Otros procedimientos

Cada investigador que propone una técnica analítica de separación de isoenzimas, junto a la metodología propuesta intenta la identificación de las bandas o fracciones obtenidas, para que di-cha técnica pueda tener alguna aplicación.

2.3.1. Identificación de isoenzimas por la posición de las bandas

Admitido el hecho de que para fines clínicos la separación de isoenzimas se realiza generalmente con la técnica electroforética, en ésta, las proteínas, y por tanto las isoenzimas, se van situando en el soporte de acuerdo a un compromiso entre la carga eléctrica neta, tamaño y forma de la macromolécula, voltaje, fuerza iónica, pH del electrolito, viscosidad del medio, interacción entre la proteína y el soporte, tiempo de la operación, etc.

Dadas las numerosas variables que intervienen en la métodica, la posición de las isoenzimas puede variar sustancialmente en cada técnica. La posición de las bandas y su identificación, en consecuencia, solo puede ser útil para cada técnica determinada y siempre que se mantengan las condiciones operatorias, por tanto, es obvio que no es posible efectuar comparaciones de la situación de bandas en dos técnicas diferentes.

Ya en los primeros trabajos de separaciones electroforéticas de isoenzimas en papel, se comparaban estas con la posición de las proteínas en el proteínograma. Así, se decía que estaban asociadas a la alfa-2-globulina (BAKER, 1954) y en ocasiones a la alfa-1-globulina.

El mismo punto de vista se ha tenido cuando se han utilizado otros soportes con un mayor poder de resolución. Mediante la electroforesis en gel de agarosa, las pocas bandas obtenidas no solo han sido asociadas a la movilidad de emigración de las proteínas sino que también con la banda resultante de sueros pataológicos, elaborándose con ambos datos mapas posicionales (HAIJE y DE JONG, 1963). Con la técnica anterior, se han encontrado resultados coincidentes respecto a la técnica de electroforesis de almidón en bloque, utilizada por otros autores (KEIDING, 1959, 1964).

Con la metódica de electroforesis en gel de almidón se llega a precisar más la posición de algunas bandas. Así, con un suero de un paciente con ictericia obstructiva, una banda la sitúan entre la beta-globulina y la haptoglobulina (MARKERT, 1959). Otras bandas asimismo, como la fosfatasa alcalina ósea la encuentran en las proximidades de la transferrina (CHIANDUSSI, 1962; WARNOCK, 1966).

En trabajos recientes, cada vez se utiliza menos, con pro

pósitos de identificación, la comparación posicional de las isoenzimas con el proteinograma clásico, la gran variedad de métodos usados y las variantes en las condiciones experimentales hacen que esos datos sean de poca utilidad en la práctica. Únicamente con aquellas técnicas de gran analogía con el procedimiento usado en el proteinograma, todavía se siguen refiriéndose a la posición de las proteínas.

De mayor utilidad resultan los Rf. Estos generalmente se obtienen a partir de la banda de albumina coloreada con azul de bromofenol (LEE, 1975). Los Rf de las bandas se obtienen por cociente entre la distancia recorrida por cada banda desde el punto de aplicación y la distancia recorrida por la banda de la albumina. Con este procedimiento de normalización se eliminan las variaciones de posición debidas al tiempo de la electroforesis, etc.

2.3.2. Métodos de identificación de isoenzimas basados en la estabilidad

Se acepta en la actualidad que la activación catalítica de las proteínas se encuentra localizada en los llamados centros activos, los cuales, presentan una configuración estructural específica para el proceso a realizar. Si por cualquier causa cambia la geometría del centro, la disposición de cargas eléctricas, o sea, la densidad electrónica en esa zona o bien cambios de componentes en esos centros activos, la actividad catalítica de la enzima puede disminuir e incluso llegar a su anulación.

La conformación de las proteínas puede ser alterada por varios agentes que en principio se pueden clasificar en físicos

y fisico-químicos. En el grupo de agentes físicos, la agitación térmica se ha utilizado con fines de identificación de las isoenzimas de la fosfatasa alcalina. Dentro del grupo fisico-químico se pueden incluir aquellos agentes que ejercen una acción sobre la configuración electrónica bien del centro activo o de sus alrededores o bien sobre la estructura general de la proteína. En este último grupo pueden ser considerados el pH, fuerza iónica del medio, por presencia de sustancias electrónicamente activas como la urea, etc.

Generalmente, el daño por estos agentes en la proteína es irreversible que se traduce en pérdida de centros activos o su equivalente en pérdida de acción catalítica, llegándose a la inactivación total.

Como cada isoenzima tiene una estructura propia, su estabilidad a estos agentes es diferente y esta gradación de resistencia a la acción de esos agentes sirve para distinguirlas unas de otras.

2.3.2.1. Estabilidad al calor

Desde antiguo se conoce la desnaturalización de las proteínas por la temperatura, consecuentemente, la actividad catalítica de las enzimas en general se verá afectada por esta causa y de hecho son muy sensibles a la temperatura, perdiendo actividad si se rebasa los límites propios de cada enzima. La variación en la pérdida de actividad es diferente para cada isoenzima. Esta pérdida de actividad se debe a cambios estructurales debidos a la agitación térmica, la cual, aumenta con la temperatura produciéndose rotura de enlaces químicos.

- A la temperatura ambiente, la fosfatasa alcalina es generalmente estable en medio neutro o ligeramente alcalino. A temperaturas de -20°C , dicha enzima resiste siempre que el tiempo no sea demasiado largo, unos seis meses (CHEN, 1976).

A temperaturas superiores a 50°C la estabilidad de la fosfatasa alcalina difiere de unas a otras isoenzimas. La desorganización proteica es una función temperatura-tiempo, o sea, a una temperatura determinada la destrucción prosigue con el tiempo. Los investigadores han adoptado la temperatura de 56°C en sus trabajos para el estudio de la estabilidad al calor (POSEN y col., 1965) si bien para isoenzimas muy resistentes, como la placentaria, han utilizado el nivel de 70°C (NEALE y col., 1965).

La técnica de estabilidad al calor ha sido utilizada por varios autores para la identificación de las isoenzimas y para la determinación del tejido productor de la hiperfosfatasaemia (POSE, 1965; CURZEN y MORRIS, 1968; KAPLAN, 1972; KAZUMASA, 1977; CROFTON y SMITH, 1978).

Como resumen a la estabilidad al calor de la isoenzima a 56°C y 15 min. puede decirse (CHEN, 1976):

- Resistentes: Isoenzima placentaria
Isoenzima intestinal
- Labiles : Isoenzima ósea
Isoenzimas hepáticas
- Actividad residual de tejidos: Hueso 11%
Hígado 21%
Placenta 87%
Intestino 90%

- La estabilidad de la isoenzima hepatobiliar es mayor que la hepática.

En enfermos con tumores, se ha encontrado una fracción de la fosfatasa alcalina resistente al calor, las isoenzimas Regan y Nagao son bastante análogas a la placentaria (FISHMAN y col., 1968; NAKAYAMA y col., 1970).

En la bilis se ha observado una fosfatasa alcalina de características diferentes a las hepáticas. En el paso del hígado a la bilis la fosfatasa alcalina adiciona un grupo de fosfatidilcolina lo que hace aumentar la estabilidad al calor (KAPLAN, 1972) (CHEN, 1976).

2.3.2.2. Estabilidad a la concentración de hidrogeniones

La fosfatasa alcalina es sensible a los cambios de pH. Si estos cambios no son muy pronunciados la actividad catalítica se recupera, pero cuando el pH se aleja de la zona óptima y la acción se ejerce durante bastante tiempo, la enzima puede quedar alterada y no recupera su actividad al volver a las condiciones óptimas. Se acepta que tanto los iones hidrógeno como hidroxiliones pueden producir cambios conformacionales que llegan a ser irreversibles. La estabilidad de cada isoenzima es diferente.

La incubación de la fosfatasa del hueso a un pH de 3.5 durante 20 minutos causa la completa inactivación, mientras que la fosfatasa hepática retiene alrededor del 50% de su actividad en las condiciones anteriores cuando la determinación de la fosfatasa alcalina se efectúa a un pH de 9.9 (EATON y MOSS, 1968). En estas mismas condiciones la enzima intestinal apenas queda afectada (BUTTERWORTH y MOSS, 1967).

Las fosfatasa renales también se inactivan al ser sometidas a un pH ácido, pero pueden ser reactivadas por incubación a 30°C durante 30 minutos y pH de 7.6, siempre que el pH no haya sido inferior a 3.5. Prácticamente, no se produce recuperación a pH por debajo de 3.3 (BUTTERWORTH, 1968).

2.3.2.3. Inactivación por urea

La urea es una sustancia que corrientemente es utilizada como inhibidor para la fosfatasa alcalina. Su acción es variable en las isoenzimas y por ello se aplica para diferenciarlas. Su mecanismo de acción no es de fácil explicación; puede ser debida a ocasionar cambios estructurales en la proteína. Su efecto depende de la concentración, temperatura y pH (BUTTERWORTH y MOSS, 1967; BIRKETT y col., 1967; BARHR y WILKINSON, 1967).

A bajas concentraciones, como 0.5 M, su efecto es variable pero generalmente produce una exaltación de la actividad catalítica en la mayoría de los sueros, especialmente si el sustrato es fenilfosfato (WILKINSON, 1970).

A concentraciones superiores a 3 M la inactivación es general con porcentajes de inhibición diferente para cada isoenzima (BIRKET y col., 1967; WILKINSON, 1970). Así

<u>Urea 2 M</u>	Tejido	Hueso	:	Inhibición casi completa
		Hígado	:	" 70%
		Riñón	:	" 80%
		Intestino	:	" 40%
		Placenta	:	" 25%

<u>Urea 3 M (14 minutos)</u>	Suero de enf. óseas :	Inhibición	83%
	" normales :	"	62%
	" de hepáticos :	"	48%
	" de embarazadas:	"	26%

Hay cierta correlación entre la inactivación producida por el calor y la urea. En los laboratorios clínicos se utiliza más frecuentemente la inactivación por el calor ya que la técnica es más sencilla.

2.3.3. Inhibición por L-Fenilalanina

Desde que se tuvo la evidencia de que existen isoenzimas en la fosfatasa alcalina mediante métodos electroforéticos, se intentaron otros procedimientos que sirvieran para la identificación de las distintas fracciones. Quizás, uno de los más interesantes, por sus características, es la respuesta de las diferentes isoenzimas a los inhibidores. Por inhibidor se entiende, en su sentido más amplio, la pérdida total o parcial, reversible o irreversible, de la actividad catalítica por acción de una sustancia o agente físico-químico en el sistema enzimático. Dentro de los inhibidores hay que distinguir los específicos de los inespecíficos.

Para la fosfatasa alcalina se han utilizado diversas sustancias como inhibidores. Entre las sustancias ensayadas se puede mencionar los aminoácidos, sales biliares, etc. (BODANSKY, 1937; AHMED y col., 1959). En estudios posteriores (FISHMAN y col., 1962) se observó que determinados aminoácidos producen inhibiciones específicas en la fosfatasa alcalina procedente de tejidos intestinales y placenta. La L-Fenilalanina es un inhibidor específico mien

tras que su estereoisómero la D-Fenilalanina no lo es (FISHMAN y col., 1963). Asimismo, tienen efectos inhibidores el L-Triptofano y la L-Leucina sobre la fosfatasa placentaria (LIN y col., 1971). La L-Homoarginina (KELLEN, 1971), imidazol (BRUNEL, 1972) y levamisol (BELLE, 1972) inhiben la fosfatasa alcalina ósea y hepática.

Estas inhibiciones con aminoácidos son de tipo estereoespecíficas y no competitivas. Se han propuesto modelos para el mecanismo de este tipo de inhibición (FISHMAN y GHOSH, 1967; FERNLEY y WALKER, 1970; LIN y col., 1971). De todos los inhibidores el más utilizado es la L-Fenilalanina, cuya acción depende de la concentración, pH, naturaleza del medio, etc. (GHOSH y FISHMAN, 1966; FISHMAN y col., 1967). Así, la fosfatasa intestinal humana presenta un máximo de inhibición a pH 9,2 con fenilfosfato como sustrato mientras que la placentaria su máximo de inhibición se encuentra a pH 9,6.

La concentración de L-fenilalanina también tiene influencia. Si bien la máxima inhibición tiene lugar en la fosfatasa intestinal a una concentración de 0.007 M de L-fenilalanina, con propósitos de diferenciación de isoenzimas es preferible utilizar una concentración de 0.005 M (FISHMAN y GHOSH, 1967). Para eliminar inhibiciones o activaciones no específicas es conveniente efectuar simultáneamente un ensayo con D-Fenilalanina.

Con la L-fenilalanina 0.005 M, a modo de resumen, son inhibidas las fosfatasas alcalinas de intestino y placenta y quedan sin afectar las isoenzimas ósea y hepáticas.

2.3.4. Tratamiento con neuroaminidasa

La neuroaminidasa es una enzima que escinde los grupos siálicos terminales de las sialoproteínas. El ácido siálico contiene en su molécula grupos ionizables y activos electronicamente que a pH ligeramente alcalino quedan cargados negativamente y emigran hacia el ánodo en la electroforesis. La incubación de la enzima con neuroaminidasa elimina grupos terminales de ácido siálico causando una pérdida de cargas negativas y con ello un enlentecimiento en la movilidad electroforética.

El tratamiento de la neuroaminidasa en algunas fosfatasa alcalinas demostró que poseían grupos terminales de ácido siálico (ROBINSON y PIERCE, 1964).

En trabajos posteriores (POSEN, 1967) se observó que la fosfatasa ósea que emigraba en la zona de la alfa-2-globulina, después de un tratamiento con neuroaminidasa se retrasaba y quedaba a la altura de la gamma-globulina. La anterior observación fue confirmada y ampliada a la fosfatasa hepática, la cual, también queda retardada por la neuroaminidasa (MOSS y col., 1966, 1967; FISHMAN y col., 1967, 1968; GHOSH y col., 1967) (USATEGUI-GOMEZ y TARBUTTON, 1973). La fosfatasa alcalina placentaria también es sensible a la acción de la neuroaminidasa con pérdida de movilidad electroforética. El contenido en ácido siálico de esta isoenzima es del 1.5% (FISHMAN y GHOSH, 1967; GHOSH y col., 1967).

De todas las isoenzimas de la fosfatasa alcalina la única que no es afectada por la neuroaminidasa es la intestinal, lo cual, constituye una propiedad característica de la misma (POSEN, 1967; MOSS y col., 1966, 1967); se acepta que la isoenzima intestinal no contiene grupos terminales de ácido n-acetilneuroamínico.

2.3.5. Otros procedimientos de identificación de isoenzimas

Para la identificación de las isoenzimas de la fosfatasa alcalina además de los procedimientos anteriormente reseñados se han aplicado otros que si bien tienen pequeña importancia práctica en los laboratorios clínicos en determinadas ocasiones y estudios pueden ser de utilidad. Se pueden mencionar la acción del EDTA, determinación de las actividades relativas a sustratos, propiedades inmunoquímicas, etc. El primer procedimiento indicado es de fácil ejecución, mientras que los otros requieren una manipulación mayor y especializada.

EDTA

El ácido etilentetraaminoacético, EDTA, se ha utilizado por su propiedad quelante sobre los iones metálicos que al retirarlos del sistema enzimático y ser precisos para la actividad catalítica de la metalenzima, ocasiona la inactivación de la misma. En las condiciones usadas de 0.01 M de EDTA, todas las isoenzimas de la fosfatasa alcalina aparecen inactivadas excepto la placentaria (KITCHENER y col., 1965).

El EDTA además de su acción secuestrante de iones parece tener otro efecto distinto, como el de formar complejos con la molécula de la enzima.

Actividad relativa a sustratos

Generalmente cada isoenzima presenta diferencias en la actividad catalítica frente al mismo sustrato (NISSELBAUN y col., 1961) y esta particularidad puede servir para su caracterización y diferenciación. Para la determinación de la constante de Michaelis

lis es necesario que las condiciones experimentales del sistema enzimático estén bien definidas; la pureza de la enzima es esencial. De todas las isoenzimas de la fosfatasa alcalina únicamente la placentaria ha sido aislada y purificada con cierta garantía y se conoce la constante de Michaelis para algunos sustratos (HARKNESS, 1968). Sin embargo, de fracciones electroforéticas se ha podido caracterizar las isoenzimas de algunos tejidos por sus R_m. Posteriormente, se ha aplicado este procedimiento a sueros patológicos y de las fracciones de la fosfatasa alcalina separadas electroforéticamente se han obtenido las constantes de Michaelis para el sustrato beta-naftil-fosfato (MOSS y col., 1961, 1962).

Propiedades inmunoquímicas

Un anticuerpo formado de un antígeno puro, como es sabido, solo reacciona exclusivamente con este antígeno. Los anticuerpos preparados en animales de fosfatasa alcalina de diversos orígenes, son específicos de la proteína-enzima introducida. Una circunstancia indeseable en toda reacción inmunológica son las reacciones cruzadas entre el anticuerpo general y el antígeno de varios órganos. Una condición deseada es que la reacción antígeno-anticuerpo sea insoluble.

Schlamowitz, en 1954, fué el primero en estudiar las propiedades inmunológicas de la fosfatasa alcalina, habiéndose proseguido este estudio por varios autores (BOYER, 1961, 1963; BAMFORD y col., 1965; SUSSMAN y col., 1968; INGLIS y col., 1973; FISHMAN, 1974).

El estudio de las isoenzimas de la fosfatasa alcalina presenta grandes dificultades mediante la técnica inmunológica debido a que en cada órgano existen casi todas las isoenzimas en dife

rente proporción, y por tanto, tienen lugar reacciones cruzadas que impiden llegar a conclusiones. Podría mejorarse la especificidad de cada isoenzima con purificaciones de las fosfatasas del órgano.

2.4. APLICACIONES DE LAS ISOENZIMAS EN CLINICA

Una elevación de la fosfatasa alcalina total en suero es indicativo de una alteración patológica en algún órgano productor de la misma, de aquí la utilidad de la separación de las diferentes fosfatasas alcalinas para tener información del origen de su mayor componente o de la variación de la relación entre las fracciones y con ello interpretar tal hallazgo patológico (KAPLAN, 1972).

Aún cuando las causas exactas de la elevación de la F. A. en suero aún se desconocen, parece ser que existe una correlación bien definida entre el aumento de las isoenzimas de la fosfatasa alcalina y el daño orgánico existente por liberación de la enzima del tejido cuyo metabolismo está alterado o estimulado (ESBRIT, 1975).

Fisiológicamente, la fosfatasa alcalina total en suero aumenta en determinadas situaciones por incremento de algunas isoenzimas. La fracción ósea se encuentra elevada en los niños en crecimiento, estabilizándose su cifra al terminar la pubertad, alrededor de los 15 años (SERENY y McLAUGHLIN, 1970), este valor es más alto en niños que en niñas (ROUND, 1973). La fracción intestinal aparece aumentada tras comidas ricas en grasa por intervenir activamente en el transporte y absorción de las grasas; está condicionada genéticamente al tipo sanguíneo O o B (BAMFORD y

col., 1965) en individuos secretores por saliva de ABH, Le, etc. La elevación de la fosfatasa alcalina placentaria se observa en el tercer trimestre del embarazo y desaparece a los tres o cuatro días después del parto (ESBRIT, 1975).

Patologicamente se aprecia elevación de la isoenzima ósea en todos aquellos procesos en que hay un aumento de la función osteoblástica. Este aumento obedece a la necesidad de niveles altos de la enzima para asegurar que el fósforo inorgánico producido por la acción de la misma sobre los esterres del ácido fosfórico se combina con el ión calcio para precipitar fosfato cálcico en el lugar de la oseificación. Mediante técnicas histológicas se ha encontrado la isoenzima ósea en la célula osteoblástica y se ha observado la existencia de una correlación directa entre el nivel de la fosfatasa alcalina en suero y el número de células osteoblásticas en el hueso (ESBRIT, 1975). Por esta misma razón hay un aumento de la fosfatasa alcalina ósea en la enfermedad de Paget, raquitismo, osteomalacia en regeneración, hiperfunción paratiroidea si existe participación ósea, sarcoma osteogénico, displasia fibrosa, hiperfosfatasa hereditaria (SUSSMAN, 1970; BUSSEL y col., 1974) y en metástasis óseas de tumores diversos (ESBRIT, 1975).

La fosfatasa alcalina hepática aparece aumentada en aquellos procesos que cursan con una obstrucción intra o extrahepática (RHONE y col., 1973; KIM y col., 1974) o bien en enfermedades con colestasis mínimas como en la tuberculosis, sarcoidosis, metástasis, etc. (MASSARRAT, 1971; WARNES, 1972).

Se han demostrado variantes de la fosfatasa alcalina hepática que distinguen los procesos granulomatosos y metastásicos de las hepatopatías difusas (RHONE y col., 1973; AL-SARRAF, 1974;

FRITSCHÉ y ADAMS-PARCK, 1974). En ciertos casos, la asociación de la determinación de las isoenzimas de la F A a otras técnicas enzimáticas ayuda a definir aún mejor el grado de participación hepática en un proceso hepatológico dado (LEVINSON y col., 1974). Elevaciones de la fracción hepática se ha descrito en estadios precoces de la enfermedad de Hodgkin, fallo cardíaco congestivo, colitis ulcerosa, esteritis regional y en diversas infecciones bacterianas intraabdominales (AISENBERG y col., 1970; BROHULT, 1973).

Se ha descrito en la cirrosis hepática un aumento de la F A intestinal, pero no se ha podido relacionar el nivel de la fosfatasa alcalina intestinal a ningún dato clínico de la cirrosis, por lo que debe deducirse que su elevación resulta de la dificultad para catabolizar esta proteína genéticamente elevada en algunos sujetos (SATALINE y MATRE, 1963). También puede encontrarse valores altos de la F A intestinal en el infarto mesentérico y en la nefritis crónica (CALDWEL, 1974). Tumores asentados en el tracto intestinal, no incrementan grandemente esta isoenzima. Para algunos autores (ESBRIT, 1975) la determinación de la isoenzima intestinal es de menor utilidad que otras isoenzimas.

La fosfatasa alcalina placentaria al correr paralela con la madurez de los microvili del citotrofoblasto aumenta patologicamente tras el infarto placentario y en la toxemia del embarazo (ROBSONI, 1965).

La F A total también aparece aumentada en el tejido tumoral, líquidos biológicos y suero de enfermos con cáncer. Este incremento parece indicar una activación genética embrionaria en el cáncer (ESBRIT, 1975). Asimismo se ha descrito un aumento de la F A total producido por tumores de diversos carcinomas del pul

món, ovario, colón, mama, útero, en el mieloma múltiple y en otros tumores linfáticos, a expensas de las isoenzimas producidas por la célula tumoral, cuyo prototipo es la isoenzima de Regan, la cual su presencia no supera el 1,6% de los enfermos con cáncer (FISHMAN, 1968; MUÑOZ y ARRAIZA, 1974). Otras variantes de isoenzimas tumorales, como la de Nagao, prehepática, etc. han sido descritas en diferentes tumores y leucosis (ROBINSON, 1965; FISHMAN y col., 1968; WARNES, 1972). Otra variante de la Regan ha sido descrita por CROPTOM, en 1978, en un carcinoma gastrointestinal.

La importancia de las isoenzimas tumorales reside tanto en su valor diagnóstico como en un modo objetivo de seguir la respuesta al tratamiento quimioterápico. Su origen se atribuye a una fetoproteína, en su sentido más amplio, producida por el propio tumor a través de una desrepresión del genoma que dirige la síntesis proteica (MUÑOZ y ARRAIZA, 1974; ESBRIT y col., 1975). De aquí el interés del fraccionamiento isoenzimático en aquellas neoplasias con F A total, en suero, elevada, cuyo origen puede ser una manifestación paraneoplásica mejor que un signo de metástasis (ESBRIT y col., 1975).

Dado que el riñón juega un papel en el aclaramiento renal de las isoenzimas de la F A en ciertos procesos como necrosis tubular aguda, etc., se ha descrito una fosfatasa alcalina en orina de posible valor diagnóstico. Se ha encontrado tanto en sangre como en orina de sujetos con homoinjerto renal un aumento de la fosfatasa alcalina renal procedente del riñón trasplantado en caso de rechazo, lo cual puede constituir un método precoz en el diagnóstico (MOSS, 1970).

Las isoenzimas de la F A pueden aparecer aumentadas o sus relaciones alteradas en diversas enfermedades entre las que se

pueden resaltar la artritis reumatoide, hipernefroma aún sin metástasis óseas visibles (WARREN y col., 1970), pielonefritis (FONTING, 1974), arteritis de células gigantes (HALL, 1973) etc.

Existen muchos puntos oscuros en la interpretación del espectro isoenzimático de indudable interés en clínica como la elevación de la F A intestinal, la heteogeneidad de la F A biliar, las relaciones patógenas de las diferentes fracciones tumorales, etc. Es de esperar que con la determinación rutinaria de las isoenzimas de la F A puedan resolverse en el futuro muchos problemas bioquímicos y clínicos en la interpretación de los diferentes estados patológicos (KIM y col., 1974; KIYASU y PENN, 1973; ESBRT, 1975).

3. PROPOSITO DE LA TESIS
=====

3. PROPOSITO DE LA TESIS =====

La determinación de la fosfatasa alcalina en suero es un ensayo corriente en los laboratorios clínicos y en ocasiones entra dentro del conjunto de parámetros bioquímicos llamado de "screening" o perfil bioquímico. Las hiperfosfatasemias son frecuentes y están asociadas a diversas alteraciones patológicas que se asientan en distintos órganos.

Desde que se evidenciaron fracciones proteicas con actividad fosfatásica, separadas electroforéticamente o por otros medios, han sido numerosos los intentos de asociar dichas fracciones o isoenzimas con las fuentes de las afecciones patológicas para disponer de medios de información útiles para el diagnóstico diferencial así como para la evaluación y evolución del desorden, a semejanza de otras enzimas, como por ejemplo la LDH.

El hecho de que persistan los trabajos sobre isoenzimas de la fosfatasa alcalina es un claro exponente de que no se ha llegado a un conocimiento que resulte útil en la práctica clínica.

La presente memoria es un intento más en tratar de esclarecer el intrincado problema de los componentes de la fosfatasa alcalina. Se ha orientado hacia la obtención de modelos posicionales densitométricos de bandas en gel de acrilamida de sueros normales, como referencia, y patológicos; modelos que creemos puedan ser de utilidad en clínica.

Se hace un estudio preliminar para fijar las características más convenientes del gel de acrilamida con objeto de obte-

ner un máximo de resolución de bandas y una más amplia separación de las mismas con respecto a las técnicas descritas. Además, se estudia la reproductibilidad y precisión de la metódica propuesta en este trabajo para obtener información suficiente y conocer hasta que punto se pueden comparar los modelos densitométricos.

En ensayos previos se observó la aparición, en sueros considerados como normales, de un número variable de bandas y que el recorrido de la fracción de mayor movilidad electroforética era variable a pesar de que las condiciones experimentales se mantuvieran constantes. Esto último, ha sido solucionado posicionando cada banda en forma porcentual del recorrido de la banda anódica. Como las bandas intermedias se situaban en posiciones con cierta preferencia, el estudio comprende un número relativamente elevado de muestras con el fin de localizar las bandas desde un punto de vista estadístico.

Las actividades fosfatásicas de las bandas en los geles se expresan, asimismo, en forma de modelos densitométricos con valores medios de la frecuencia considerada.

Estudios semejantes a los sueros normales se realizan en homogenados de órganos, provenientes de biopsias y necropsias. De los modelos densitométricos obtenidos tanto posicionales como de actividad fosfatásica, se intenta tener información que sirva para identificar las bandas electroforéticas del gel a través del tejido ensayado.

Asimismo, se estudian sueros patológicos de enfermos bidamente diagnosticados para obtener modelos de base estadística que puedan servir como prototipos de grupos de afecciones.

Este estudio es incompleto, en cada grupo de desordenes la casuística es pequeña y solo pretende mostrar sus posibilidades.

En sueros normales, cuya población es relativamente grande, además de los modelos generales se estudian algunos factores que influyen en el modelo como edad, sexo y grupos sanguíneos.

Se realizan ensayos con los inhibidores que corrientemente se aplican a este tipo de trabajos. El estudio puede considerarse como previo a otro trabajo más extenso.

Finalmente, se estudian mezclas diversas de sueros y homogenados que han resultado de interés y que constituyen un mundo abierto a la especulación interpretativa.

4. METODOLOGIA

=====

4. METODOLOGIA

=====

4.1. PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Las muestras estudiadas en este trabajo proceden de dos orígenes:

- a) Sueros
- b) Homogenados de órganos

SUEROS

La extracción de los sueros y su conservación hasta su ensayo es análoga a la utilizada en las determinaciones de rutina de un laboratorio de Química Clínica: Extracción venosa a primera hora de la mañana en sujetos en ayunas, transferida la sangre a tubos de centrifuga y abandonada a la temperatura ambiente durante unos 30 minutos para retracción del coágulo. Para ayudar a la separación de fibrina y células se agregó a la sangre cristales de copolímeros de polivinilfenilo de densidad 1,049. A continuación se centrifuga a 2000 rpm durante 15 minutos. El suero es separado con pipeta Pasteuer y enfriado seguidamente a 4°C.

Las determinaciones se efectuaban después de que el suero adquiriera la temperatura ambiente; generalmente a las 24 horas de la extracción.

HOMOGENADOS DE ORGANOS

Las muestras de órganos provienen de dos fuentes: biopsias y necropsias.

Los órganos estudiados han sido hígado, intestino, riñón y hueso.

BIOPSIAS

Inmediatamente de la recogida de las muestras en quirófano, se sumergen en baño de hielo los frascos, posteriormente se congelan a -20°C , manteniéndose en esta forma hasta su utilización.

La preparación de las muestras fué realizada de la siguiente forma: Una vez descongeladas las muestras y termostatizadas en nevera a unos 5°C , se pesaban y se agregaba el buffer carbonato-bicarbonato 50 mM, pH 7.4 en la proporción de 1:10.

La homogeneización fué efectuada en un equipo marca "Virtis" modelo 45, en recipientes de 285 ml de capacidad con cuchillas tipo 16-108 a una velocidad correspondiente de su escala de 20, con refrigeración exterior con hielo. El tiempo total de homogeneización es de 15 minutos, en periodos de 2 minutos y descansos de un minuto. Inmediatamente el homogenado era centrifugado en centrífuga refrigerada marca Damon/IEC, a -5°C durante 10 minutos a 2000 rpm. El sobrenadante se transfería a tubos que se tapan con "nescofilm" para evitar evaporaciones.

En muestras de huesos, dada su estructura y dureza, para su homogeneización fué necesario utilizar un método diferente. Se diseñó y fabricó un mortero semejante al empleado en las técnicas mineralógicas para la pulverización de muestras. El mortero consta de tres piezas: una base con un vaciado circular donde se aloja un tubo de paredes gruesas por el que se desliza un cilindro-pistón. Todo el material es de latón duro

con un ajuste mecánico muy bueno. La muestra de hueso se coloca en el fondo del mortero y una vez introducido el pistón se golpea con un martillo hasta que el hueso queda reducido a una papilla, la cual es finalmente homogeneizada en el "Virtis".

Además de los órganos indicados anteriormente se ha ensayado el tejido placentario. Las muestras obtenidas en la maternidad se enfrían con hielo inmediatamente para su conservación. Antes de proceder a la homogeneización, las placentas son lavadas con solución salina. Una vez pesadas se agrega el buffer de carbonato-bicarbonato en la proporción de 1:25 y se homogeneizan en forma análoga a las biopsias.

NECROPSIAS

Las muestras fueron obtenidas en zonas no afectadas por las causas de fallecimiento. La toma de muestras fué efectuada lo más pronto posible para que fuera mínimo el proceso de autólisis.

La preparación de las muestras se realizó en forma análoga a la efectuada en las biopsias.

PREPARACION DEL BUFFER CARBONATO-BICARBONATO, 50 mM, pH 7.4

Se pesan 2,65 g de $\text{CO}_3\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 2,11 g de CO_3HNa . Se disuelven en unos 950 ml de agua destilada y desionizada. Se ajusta el pH de la solución a 7.4 con ClH N . Se completa con agua hasta un litro.

4.2. METODO PARA LA DETERMINACION DE LAS FOSFATASAS ALCALINAS

En este trabajo, la determinación de la actividad fosfatásica alcalina serica se ha realizado por el método utilizado, en forma rutinaria, en el laboratorio de enzimas del Servicio de Bioquímica de la ciudad sanitaria "1° de octubre" de la S.S. El método seguido es el propuesto originalmente por KING KING (1954), una modificación del procedimiento de Bessey-Wasser (1946) y adaptado al autoanalizador Beckman DSA 560 por Calbiochem.

FUNDAMENTO

En solución alcalina, pH de 10.1, la fosfatasa alcalina cataliza la hidrólisis del sustrato incoloro p-nitrofenilfosfato produciendo una sustancia amarilla el p-nitrofenol, medible fotométricamente.

REACTIVOS

1.- BUFFER pH 10.1

Pesar 210 g de 2-amino-2-metilpropanodiol-1,3 Merck. Disolver en unos 800 ml de agua destilada y desionizada. Ajustar el pH a 10.1 con solución de ClH N. Completar el volumen a 1000 ml. Guardar en nevera a 4°C. Estable durante varios meses.

2.- SUSTRATO (2 mg/ml)

Preparado diariamente en cantidad suficiente para las muestras a determinar. Pesar 200 mg de sal sódica del ácido 4-nitrofenilfosfato. $6H_2O$. Disolver en 100 ml del buffer pH 10.1. El reactivo es bastante estable.

PROCEDIMIENTO

Aún cuando la determinación rutinaria de la enzima se realiza en el autoanализador, el método es susceptible de efectuarse manualmente. En este caso el procedimiento es el siguiente:

A tubos de hemólisis de 10 cm. y diámetro interior de 1 cm. se agregan 0,9 ml del sustrato buferado, 2,1 ml de agua destilada y desionizada y 0.09 ml de la muestra a analizar. Las pipetas utilizadas deben ser del tipo aforado con certificado de garantía.

Paralelamente se lleva, a) un blanco con el sustrato buferado y agua en cantidad para completar el volumen, y b) dos sueros standards en cantidades iguales a la muestra. En este trabajo se ha utilizado Precinor E y Precipath, Boehringer.

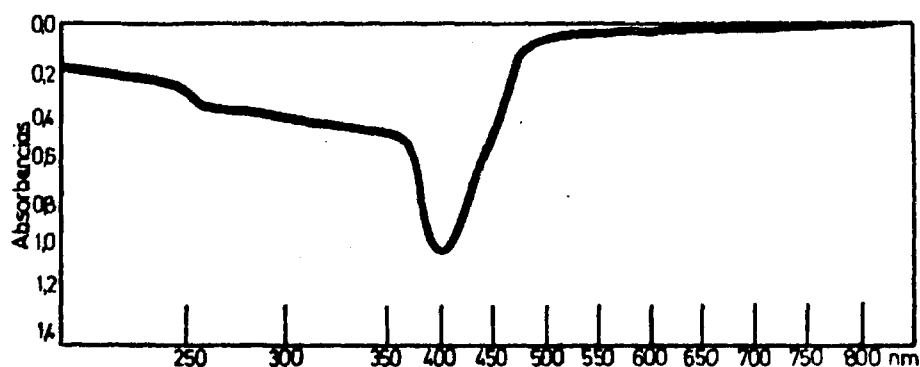
Todos los tubos, colocados en una gradilla, se incuban a 30°C durante 5 minutos en un baño de agua, cuya temperatura es controlada entre $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Inmediatamente de la incubación se hace la lectura en un espectrofotómetro (Espectronic 88) a 405 nm, en cubeta de cuarzo de un cm. de espesor, frente al blanco. Los valores obtenidos en absorbancia se transforman en unidades internacionales mediante un factor de corrección obtenido a partir de los standards.

CURVA DE ABSORBANCIA DEL p-NITROFENOL

El color desarrollado por este método, corresponde al p-nitrofenol liberado que unido a los demás solutos da lugar a la curva de absorbancia que se muestra a continuación.

Dicha curva ha sido obtenida, en el espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 402, el cual es de doble haz con dos fuentes de radiaciones para las regiones UV y visible, y dispositivo de "scanning" automático. Las cubetas son de cuarzo de un cm. de espesor. La muestra ha sido un "pool" de varios sueros analizados frente al blanco del reactivo con el sustrato.



4.2.1. Precisión del Método

La reproductibilidad de los resultados analíticos de la fosfatasa alcalina con la metodología empleada presenta interés en este trabajo para conocer el grado de confianza que merecen las determinaciones. Se han considerado varias situaciones tanto en forma automatizada como manual.

METODO AUTOMATICO

Suero conservado previamente a 4°C, dejado que adquiriera la temperatura ambiente y en estas condiciones analizado cada

tres días, repitiéndose en cada día doce veces. Los resultados se muestran a continuación:

TABLA N° 1: Actividad fosfatásica total

	<u>A₁</u>	<u>A₂</u>	<u>A₃</u>
	38,00	39,00	39,00
	39,00	38,00	39,00
	38,00	37,00	38,00
	38,00	38,00	40,00
	38,00	38,00	40,00
	37,00	38,00	39,00
	36,00	37,00	39,00
	38,00	38,00	40,00
	36,00	37,00	40,00
	37,00	36,00	39,00
	38,00	37,00	39,00
	37,00	38,00	39,00
\bar{X} =	37,50	37,58	39,25 UI
DS =	0,90	0,79	0,62
CV =	2,40	2,10	1,57 %
n° =	12	12	12

Se observa que la reproductibilidad es aceptable con un pequeño aumento de la actividad fosfatásica en el transcurso de los días a la temperatura del ambiente, hecho que ya era conocido.

En sueros diferentes con actividades superiores a la normal, también se obtiene una reproductibilidad aceptable y con un coeficiente de variabilidad muy semejante en todas las series. En la siguiente tabla se exponen los resultados hallados.

TABLA N° 2: Actividad fosfatásica total

	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>
	66,00	43,00	48,00
	66,00	45,00	48,00
	66,00	42,00	48,00
	67,00	44,00	47,00
	68,00	44,00	47,00
	68,00	44,00	48,00
	65,00	43,00	48,00
	65,00	44,00	48,00
	66,00	43,00	48,00
	66,00	43,00	48,00
	65,00	44,00	48,00
	66,00	43,00	49,00
\bar{X} =	66,16	43,50	47,91 U.I.
DS =	1,02	0,79	0,51
CV =	1,54	1,81	1,06 %
n° =	12	12	12

METODO MANUAL

TABLA N° 3: Actividad fosfatásica total

	<u>E</u>	<u>F</u>	
	61,00	90,00	
	63,00	93,00	
	61,00	87,00	
	61,00	95,00	
	62,00	93,00	
	61,00	93,00	
	66,00	97,00	
	66,00	95,00	
	66,00	95,00	
	59,00	95,00	
	61,00	93,00	
	63,00	91,00	
\bar{X} =	62,50	93,08	U.I.
DS =	2,35	2,71	
CV =	3,76	2,91	%
n° =	12	12	

Como era de esperar, el coeficiente de variabilidad en el procedimiento manual es algo superior que cuando se utilizan los métodos automáticos.

4.2.2. Linealidad en la determinación de la fosfatasa alcalina

Las determinaciones de las actividades enzimáticas, como es sabido, presentan una variabilidad superior a las determinaciones de otros parámetros bioquímicos. Las medidas de exactitud, por ello, están afectadas de errores y siempre hay incertidumbre en el valor obtenido. La linealidad, como una medida de la exactitud a diversos niveles de concentración, es quizás el ensayo más efectivo de la misma desde un punto de vista general y en particular en las determinaciones basadas en una reacción cinética.

Para efectuar el ensayo de linealidad se ha partido de un suero con una actividad enzimática bastante superior a la normal, y se han tomado volúmenes del mismo en distinta cuantía.

En el procedimiento, seguido en el autoanalizador Beckman DSA, para la determinación de fosfatasa alcalina, se toman 30 microlitros de suero y se diluyen con 200 microlitros de agua, mezcla que se transfiere a una cubeta. Otra jeringa, dispensa 300 microlitros de sustrato diluidos con 500 microlitros de agua. Después de una incubación se efectúa la fotometría. El blanco, o sea el líquido de comparación, contiene los mismos componentes pero la lectura se hace sin incubación. El ensayo de linealidad con este equipo se ha realizado por ajustes sucesivos de la jeringa de toma de muestra, manteniéndose constante la cantidad de agua.

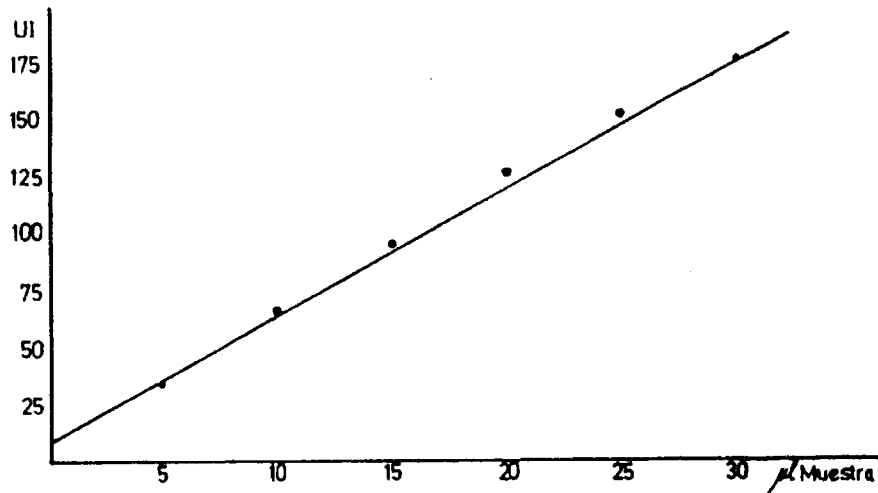
La serie preparada contiene 5, 10, 15, 20, 25 y 30 micro litros de un suero cuya FA es de 175 UI. Los resultados obtenidos son:

Muestra, ρ	U.I.
<u>x</u>	<u>Y</u>
5	34
10	66
15	95
20	126
25	151
30	175

Recta de regresión

Ordenada en el origen = 17,500 U.I.
Pendiente = 3,818
Coef. correlación, r = 0,998

La correlación es muy buena. Aunque la recta de regresión no pasa por el origen, el error es relativamente pequeño y por tanto los sueros de baja actividad estaran afectados de bajo error. Debe tenerse en cuenta, además, que las desviaciones no solo se deben a la reacción cinética sino a otras causas, como son los ajustes en la toma de muestra, volumen total, etc.



4.3. SEPARACION DE ISOENZIMAS

Para la separación de las isoenzimas de la fosfatasa al calina se siguieron inicialmente las técnicas en gel de poli-acrilamida de Smith (1970), Boyer (1963), Ornstein (1964) y Dingjam (1973). Los resultados obtenidos en la separación por esos métodos no se consideraron aceptables, principalmente debido a que la resolución de las bandas no es buena. Ello indujo a intentar otra metodología modificando características del gel, tiempos de electroforesis, diluciones de la muestra y del buffer de la electroforesis, así como los pH del gel y de la electroforesis, que condujeron a un procedimiento que se consideró satisfactorio, el cual se propone en este trabajo y es la base del mismo.

4.3.1. Fundamento del Método

La separación de las isoenzimas se efectúa en gel de acrilamida que consta de tres fracciones con tamaños de poros decrecientes. En la electroforesis de disco la muestra se coloca en el extremo superior del gel y se la hace emigrar en un campo eléctrico de cátodo a ánodo, dando lugar a la separación de las isoenzimas según relación carga eléctrica-tamaño de la enzima. Estas isoenzimas separadas se revelan con un sustrato cromogénico que produce una intensidad de color de acuerdo con la actividad enzimática de cada isoenzima, dando lugar a bandas en el gel. El sustrato cromogénico es el 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato, que en la hidrólisis origina una coloración azul. Después de ser lavados los geles con agua, se conservan en ácido acético diluido al 7% para su posterior densitometría. El color azul de las bandas es muy estable.

4.3.2. Material

- Tubos de vidrio neutro abiertos por ambos extremos de 85 mm de longitud y 5 mm de diámetro interior y 7 mm de diámetro exterior.
- Pipetas aforadas de 0.1, 0.2, 1.0, 2.0 y 5 ml de capacidad.
- Gradilla para soporte de 12 tubos para la polimerización del gel de acrilamida (Gel preparation rack Canalco).
- Polimerizador de luz fluorescente (Preparation Light Canalco).
- Fuente de alimentación (Electrophoresis constant Rate Source, modelo 300 B Canalco).
- Cubetas verticales (Disc Electrophoresis, modelo 1,200 Canalco).

- Baño de agua termorregulable.
- Tubos de ensayo, tipo hemólisis.

4.3.3. Reactivos

BUFFER DEL GEL

Pesar 4,55 g de 2-amino, 2-hidroximetil, 1,3, propanodiol (Canalco), 0,12 ml de N,N-tetrametiletilendiamino, (TEMED (Canalco) y 0,050 g de ácido Bórico (Merck). Disolver en agua destilada y desionizada en matraz aforado de 100 ml. El pH del buffer debe ser de 10,6. Guardar en frasco color topacio en nevera a 4°C. Estable durante un año.

SOLUCION DE ACRILAMIDA (Poro 9%)

Pesar 35.06 g de acrilamida (Canalco), 1,17 g N,N-metilen-bis-acrilamida (BIS) (Canalco). Disolver en 100 ml de agua destilada y desionizada en matraz aforado. Guardar en frasco de color topacio en nevera a 4°C. Estable durante un año.

SOLUCION DE ACRILAMIDA (Poro 7%)

Pesar 28,0 g de acrilamida (Canalco) y 0,52 g de N,N-metilen-bis-acrilamida (BIS) (Canalco). Disolver en 100 ml de agua destilada y desionizada en matraz aforado. Guardar en frasco de color topacio en nevera a 4°C. Estable durante un año.

SOLUCION DE ACRILAMIDA (Poro 4%)

Pesar 15,58 g de acrilamida (Canalco) y 0,52 g de N,N-metilen-bis-acrilamida (BIS) (Canalco). Disolver en 100 ml de agua destilada y desionizada en matraz aforado. Guardar en frasco de

color topacio en nevera a 4°C. Estable durante un año.

SOLUCION DE PERSULFATO AMONICO

Pesar 0,14 g de persulfato amónico (Canalco). Disolver en 100 ml de agua destilada y desionizada en matraz aforado. Guardar en frasco de color topacio en nevera a 4°C. Estable durante 15 días.

BUFFER RESERVORIO

Pesar 45,5 g de 2-amino,2-hidroximetil,1,3-propanodiol (Canalco) y 15 g de ácido bórico (Merck). Disolver en 1000 ml de agua destilada y desionizada en matraz aforado. La solución debe tener un pH de 8,5. Guardar en frasco de color topacio en nevera a 4°C. Estable durante un año.

SOLUCION DE SACAROSA

Pesar 20 g de sucrosa (Canalco). Disolver en 100 ml de agua destilada y desionizada en matraz aforado. Agregar unos miligramos de bromofenol para que la solución adquiriera un color azul. Guardar en nevera a 4°C. Estable durante un año.

SOLUCION DE CROMOGENO

Pesar 13,4 mg de 5-bromo,4-cloro,3-indolil fosfato (Sigma), 173,1 mg de ácido bórico (Merck), 109,7 mg de cloruro de magnesio hexahidratado (Merck), 2-amino,2-hidroximetil,1,3-propanodiol (Canalco) y 0,21 ml de N,N-dimetil-formamida (Sigma). Disolver en 100 ml de agua destilada y desionizada en matraz aforado. La solución debe tener un pH de 9,0. Guardar en frasco de color topacio en nevera a 4°C. Estable durante un mes.

4.3.4. Limpieza del material de vidrio

El material de vidrio usado o nuevo se lava cuidadosamente con agua que contenga detergentes y se aclara bien con agua destilada. Seguidamente, se sumerge el material de vidrio en mezcla crómica, cuya preparación se detallará más adelante, durante una hora. A continuación se aclara cuidadosamente con agua destilada y desionizada. Los tubos limpios como acaba de indicarse se sumergen en un vaso de precipitados que contiene una solución del tensoactivo "Colum Coat" (Canalco) al 1% donde se dejan estar 15 minutos por lo menos o bien indefinidamente.

La mezcla crómica concentrada se prepara disolviendo 20 g de dicromato potásico en 50 ml de agua destilada. A la solución se agrega poco a poco y agitando un litro de ácido sulfúrico concentrado de densidad 1,84. La mezcla se guarda en frasco con tapón esmerilado.

La mezcla crómica para la limpieza de los tubos se prepara por dilución de la concentrada con agua destilada en la proporción de 1:4.

4.3.5. Preparación del gel

El gel conta de tres zonas, de porosidades 9, 7 y 4% y se prepara a partir de sus soluciones respectivas obtenidas antes de ser utilizadas y en cantidades apropiadas. Las soluciones están compuestas de

a) Solución para gel 9%

Buffer del gel

1 volumen

Sol. de acrilamida (Poro 9%)	2 volumen
Agua dest. y desion.	1 "
Sol. de persulfato amónico	4 "

b) Solución para gel 7%

Buffer del gel	1 volumen
Sol. de acrilamida (Poro 7%)	2 "
Agua dest. y desion.	1 "
Sol. de persulfato amónico	4 "

c) Solución para gel 4%

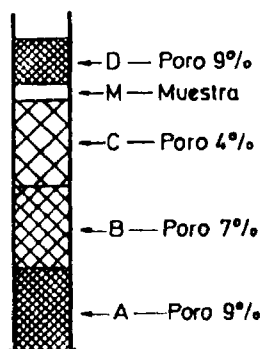
Buffer del gel	1 volumen
Sol. de acrilamida (Poro 4%)	2 "
Agua dest. y desion.	1 "
Sol. de persulfato amónico	4 "

La preparación del gel se realiza según los pasos siguientes:

- 1.- Sacar los tubos de gelificación del líquido con el detergente "Colum Coat". Dejar escurrir bien.
- 2.- Cerrar un extremo del tubo con nescofilm y colocarlo en la gradilla de polimerización con el extremo tapado como fondo.
- 3.- A cada tubo se pone, con pipeta, 0,3 ml de la solución (a) recientemente preparada y bien mezclada.
- 4.- Agregar a los mismos tubos, deslizando el líquido por las paredes para evitar su mezcla con el anterior, otros 0,3 ml de solución (b).

- 5.- Con las mismas precauciones, añadir 0,3 ml de solución (c) a los tubos.
- 6.- Finalmente, agregar 0,2 ml de agua destilada y desionizada haciéndola, asimismo, deslizar por las paredes del tubo para no perturbar las capas de las anteriores soluciones. Esta capa superior de agua tiene la misión de evitar la formación de un menisco en la gelificación.
- 7.- Colocar la gradilla con los tubos próxima al polimerizador de luz fluorescente durante una hora.
- 8.- Retirar los tubos con los geles de la gradilla y colocarlos en un vaso de precipitados. Guardarlos en nevera a 4°C donde deben permanecer durante 3 días. Si se utilizaran antes de este tiempo los geles quedarían muy frágiles y se romperían con facilidad.
- 9.- Después de tres días en nevera los geles se encuentran en condiciones de ser utilizados durante un mes. Pasado este tiempo, se producen cambios en el gel con alteración de sus características como fuerte adherencia en las paredes y consiguientes roturas del gel.

El esquema siguiente muestra las capas del gel y sus porosidades



4.3.6. Electroforesis en el gel

- 1.- Eliminar la capa superior de agua de los tubos con los geles por inversión de los mismos. Dejar escurrir.
- 2.- Depositar la muestra en la parte superior del gel en cantidad de 25 a 30 microlitros.
- 3.- Adicionar otros 25 a 30 microlitros de solución de sacarosa y mezclarla con la muestra golpeando el tubo suavemente con los dedos. Esta mezcla corresponde a la capa M del esquema.
- 4.- Agregar al tubo 0,2 ml de solución de acrilamida (a) por deslizamiento en la pared. como en la preparación del gel. Corresponde a la capa D del esquema.
- 5.- Finalmente, adicionar con análogos cuidados 0,2 ml del buffer utilizado para electroforesis.
- 6.- Polimerizar la solución de acrilamida, capa D, por irradiación de luz fluorescente durante 30 minutos. Esta polimerización es importante para la electroforesis.
- 7.- Quitar la tapa inferior de nescofilm y colocar, a través de su goma, los tubos en la cubeta de electroforesis, con la capa portadora de la muestra en la parte superior.
- 8.- Llenar en cantidad suficiente, unos 750 ml, los compartimentos de la cubeta con el buffer de electroforesis. Este buffer se prepara diluyendo con agua destilada y desionizada el buffer reservorio en la proporción 1:4 (150 ml de buffer y 600 ml de agua).
- 9.- Aplicar una corriente de 2 mA por tubo durante unos 30 minutos. En este tiempo la albúmina unida al bromofenol en forma

de una banda debe desaparecer del gel. Cortar la corriente eléctrica.

NOTA: Debe cuidarse de que no existan burbujas de aire en los tu bos. Su presencia impide la migración de las fracciones.

4.3.7. Revelado de la actividad enzimática

- 1.- Separar el gel del tubo mediante una aguja de inyectables uni da a una jeringa y cargada ésta con agua destilada, la aguja se hace deslizar entre la pared del tubo y el gel superior in yectando al mismo tiempo agua con fuerza. De esta manera el gel completo se desprende del tubo y se recoge en tubo de he- molísis. Con este proceder se rompe el gel por la capa porta- dora de la muestra (capa D) la cual se desecha.
- 2.- Lavar el gel con agua del grifo en la palma de la mano. Vol- ver el gel al tubo de hemolisis.
- 3.- Agregar la solución de cromógeno hasta cubrir el gel.
- 4.- Colocar los tubos en gradilla e incubar en baño de agua a 37°C durante toda la noche.
- 5.- En los lugares correspondientes a las fracciones fosfatásicas separadas se forman bandas.
- 6.- Quitar la solución de cromógeno y lavar con agua destilada va rias veces el gel.
- 7.- Conservar el gel con solución de ácido acético al 7%.
- 8.- Cerrar los tubos con nescofilm y guardar en nevera a 4°C. En estas condiciones las coloraciones de las bandas de los geles

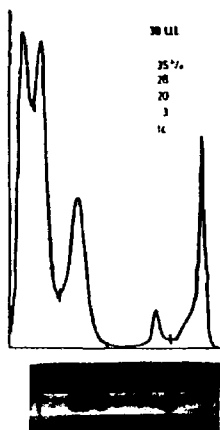
permanecen inalteradas en el tiempo.

4.3.8. Densitometría de las bandas del gel

La intensidad del color en el gel se ha determinado por densitometría. El equipo utilizado ha sido el aparato "VERNON. Photometer Integrateur Enregistreur". En este equipo, las condiciones operatorias fueron las siguientes:

- Filtro naranja n° 22
- Línea de base, entre x10 o x50
- Lectura en transmitancia
- Raport en 2, en automático.

El procedimiento seguido fué: El tubo que contiene el gel con su conservante, se coloca en el transportador de geles sujeto mediante abrazaderas. El transportador es accionado por unos rodillos que le imprime un movimiento de traslación que hace pasar el gel por la rendija del densitómetro. En la primera pasada, se imprime la gráfica y se totaliza toda la energía radiante que llega al fototubo. En la segunda pasada del gel por la rendija cada banda es porcentuada respecto al total y su valor aparece en el contador digital.



4.3.8.1. Reproducibilidad del densitómetro

Para el estudio cuantitativo de la actividad enzimática de las bandas en los geles es necesario conocer la variabilidad en la medida fotométrica en los diversos tipos de bandas. Algunas de estas, aparecen aisladas en el gel, pero con gran frecuencia la resolución de las bandas es tan pequeña que en las gráficas aparecen como hombros de picos grandes, lo cual, presenta dificultades en la densitometría.

La reproducibilidad se determinó repitiendo la lectura del mismo gel durante doce veces. Los geles ensayados presentaban distintas características como posición de las bandas, número de éstas, actividad fosfatásica del suero y efectuada la medida en días diferentes. El orden de las bandas que aparecen en los cuadros es de ánodo a cátodo.

Los resultados obtenidos con sus parámetros estadísticos se muestran a continuación:

Suero con tres bandas con actividad fosfatásica de 37 UI.

1	66,50	20,40	13,00
2	68,10	20,10	13,40
3	67,00	19,40	13,00
4	65,10	21,60	12,90
5	67,20	22,70	12,30
6	66,50	19,50	13,30
7	67,50	18,20	13,00
8	65,10	20,50	12,20
9	66,20	20,00	12,20
10	68,40	20,00	12,40
11	68,00	18,50	11,90
12	66,50	20,50	13,10
$\bar{X} =$	66,84 %	20,28	12,72
D E =	1,07	1,33	0,49
C V =	1,6 %	6,55	3,85

Suero con tres bandas con actividad fosfatásica de 39 UI.

1	81,30	5,90	11,80
2	81,80	5,40	12,90
3	80,00	4,60	10,00
4	81,00	5,80	8,80
5	80,80	6,20	9,80
6	84,40	5,10	11,00
7	84,30	6,30	10,70
8	83,30	6,00	11,70
9	83,00	5,00	12,50
10	85,40	5,10	12,00
11	82,70	4,10	10,60
12	81,60	4,10	9,50
\bar{X} =	82,46	----- 5,30	----- 10,94
D E =	1,65	----- 0,76	----- 1,26
C V =	2,0%	-----14,30	----- 11,51

Suero con cuatro bandas con actividad fosfatásica de 43 UI.

1	62,20	25,70	3,00	10,50
2	60,30	25,70	3,10	11,20
3	62,20	25,70	3,00	11,00
4	59,90	25,50	3,10	10,50
5	59,30	23,30	3,10	11,00
6	60,60	25,80	3,30	10,60
7	61,30	25,20	3,10	11,20
8	62,40	26,60	3,00	10,90
9	60,50	25,70	2,50	11,00
10	60,60	23,60	2,50	11,00
11	60,40	26,30	3,10	10,60
12	61,80	24,20	2,80	10,80
\bar{X} =	60,45	----- 25,77	----- 2,96	----- 10,85
D E =	1,00	----- 1,03	----- 0,24	----- 0,25
C V =	1,64	----- 4,07	----- 8,10	----- 2,30

Suero con cinco bandas y actividad de 66 UI.

1	51,50	27,10	3,50	6,10	11,20
2	52,00	26,80	3,10	5,90	13,20
3	52,50	25,60	3,20	6,20	13,40
4	52,00	27,40	3,80	6,20	13,30
5	52,40	26,80	2,90	6,10	12,30
6	52,10	26,70	2,70	6,40	12,40
7	53,10	25,30	3,00	6,00	12,10
8	52,40	27,80	3,10	6,50	13,50
9	51,80	28,30	3,30	6,50	14,20
10	52,80	27,00	2,80	6,10	12,10
11	50,20	29,60	2,90	6,80	12,80
12	52,70	27,70	3,30	6,30	12,80
$\bar{X} = 52,12 \text{ --- } 27,17 \text{ --- } 3,13 \text{ --- } 6,25 \text{ --- } 12,77$					
$D E = 0,75 \text{ --- } 1,4 \text{ --- } 0,31 \text{ --- } 0,25 \text{ --- } 0,80$					
$C V = 1,43 \text{ --- } 4,19 \text{ --- } 10,00 \text{ --- } 4,00 \text{ --- } 6,20$					

La variabilidad en la lectura densitométrica de un mismo gel depende de la intensidad de color de la banda y de las características de la misma. Los límites de las áreas integradas de cada banda por el densitómetro no siempre aparecen justamente marcadas en el mismo sitio debido al funcionamiento del aparato, lo cual unido a otras causas ocasiona la dispersión en la medida. El coeficiente de variabilidad es máximo en áreas pequeñas y mínimo en áreas grandes. En conjunto, la reproductibilidad de la medida de la intensidad de color en las bandas debido a la densitometría es aceptable.

4.3.8.2. Precisión en la densitometría de los geles

Como las condiciones experimentales, como ajustes, etc, pueden cambiar ligeramente cada día en el densitómetro, se han realizado unos ensayos para conocer la variabilidad en la lectura densitométrica de las bandas del gel.

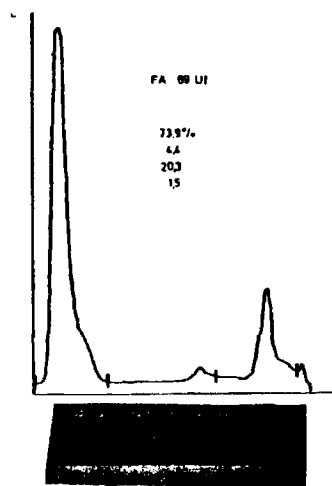
En ensayo consiste en efectuar la densitometría del mismo gel, doce veces cada sesión, en días diferentes. El gel pertenece a un suero con una actividad fosfatásica de 69 UI correspondiente a un enfermo diagnosticado de asma intrínseca. En la densitometría se observa un hombro en la banda anódica que no ha sido integrado por el aparato. El número de bandas medidas es de 4, si bien, visualmente, se observa que el hombro en la gráfica de la banda anódica aparece separada nitidamente en el gel como una banda, no habiendo sido contabilizada por el densitómetro. Debe hacerse la observación de que la suma de las áreas de las bandas raramente resulta ser el 100%.

RESULTADOS

	Bandas				Suma
	Catódica	12-20 % recorr.	30-40 % recorr.	Anódica	
<u>Primer día</u>					
\bar{x} (%)	1,25	20,25	4,0	74,95	100,45
D.S.	0,11	0,30	0,55	1,55	-
C.V.	8,8	1,48	13,75	2,06	-
<u>Segundo día</u>					
\bar{x} (%)	1,64	20,46	3,96	74,15	100,21
D.S.	0,13	0,34	0,73	0,97	-
C.V.	7,92	1,66	18,43	1,30	-
<u>Tercer día</u>					
\bar{x} (%)	1,22	20,72	4,86	73,40	100,20
D.S.	0,25	0,69	0,77	1,26	-
C.V.	20,49	3,33	15,84	1,71	-

La precisión obtenida por el densitómetro VERNON, utilizado en este trabajo para la lectura de la intensidad de color de

las bandas en los geles de acrilamida, puede considerarse como buena. La variabilidad interdias es pequeña y no significativa.



4.3.9. Precisión en la separación de las isoenzimas

La precisión, en toda la metodología en la separación de las isoenzimas de la fosfatasa alcalina, se ha realizado a partir de un mismo suero mediante la preparación de 12 geles, manteniendo, dentro de lo posible, iguales todas las condiciones experimentales. Los resultados hallados en un suero que presenta cinco bandas con una FA de 66 UI, se muestra a continuación,

1	52,40	24,50	0,90	7,40	12,40
2	50,70	25,80	0,90	7,80	12,50
3	50,60	27,10	1,20	7,00	12,90
4	50,10	24,10	1,00	7,40	12,40
5	48,70	21,40	0,90	7,20	12,40
6	52,10	29,20	0,90	6,80	14,70
7	50,70	27,30	0,90	6,90	13,90
8	49,80	27,50	0,80	7,50	13,90
9	50,70	23,70	0,70	8,50	13,70
10	48,90	23,30	0,90	8,00	14,80
11	54,80	26,00	0,70	8,10	14,50
12	51,00	27,80	1,00	7,40	14,30

$\bar{X} = 50,87$ ---- $25,64$ ---- $0,90$ ---- $7,50$ ---- $13,53$
 $D E = 1,64$ ---- $3,27$ ---- $0,13$ ---- $0,51$ ---- $0,95$
 $C V = 3,22$ ---- $8,85$ ---- $14,44$ ---- $6,80$ ---- $7,02$

Puede observarse que el coeficiente de variabilidad en este ensayo es del mismo orden que los hallados en la precisión de la densitometría de las bandas del gel. En ambas, el coeficiente de variabilidad de las bandas pequeñas es más alto que en los picos grandes. Todo lo anterior, puede interpretarse como la metódica en la preparación del gel origina pequeña variabilidad y que la lectura en el densitómetro es la causa principal de la variabilidad, debido al solapamiento de picos y con ello la dificultad en la discriminación de éstos.

Otro tipo de ensayo ha tenido como objetivo el tratar de conocer las posibles variaciones del espectro isoenzimático durante el almacenamiento de un suero en la nevera a 4°C. Para ello, se han preparado geles, de un mismo suero, en días diferentes. Los resultados de un suero cuya actividad fosfatásica de 36 UI se exponen a continuación:

1	63,00	20,40	2,80	10,10
2	63,00	20,30	2,80	10,10
3	61,60	21,30	3,20	10,00
4	61,20	24,20	3,40	11,00
5	65,30	21,20	3,20	10,70
6	65,30	22,20	3,00	11,40
7	63,10	21,40	2,30	10,20
8	65,20	21,90	3,30	10,00
9	61,70	25,80	3,50	10,50
10	65,70	26,00	2,70	10,20
11	66,50	23,60	2,70	10,30
12	66,50	23,60	3,00	10,60

\bar{X} =	63,98	-----	22,65	-----	2,99	-----	19,42
D E =	1,98	-----	1,95	-----	0,34	-----	0,43
C V =	3,09	-----	8,60	-----	11,37	-----	4,12

El suero anterior después de 3 días en nevera a 4°C

1	56,80	16,30	0,00	21,50
2	49,50	26,70	0,00	21,70
3	53,50	24,70	0,00	20,60
4	65,70	22,20	0,00	20,20
5	61,30	24,70	0,00	20,10
6	59,40	20,80	0,00	18,50
7	59,50	26,10	0,00	14,80
8	56,30	21,00	0,00	17,80
9	59,20	21,40	0,00	11,30
10	57,20	18,80	0,00	22,00
11	61,10	25,00	0,00	23,30
12	62,10	17,10	0,00	22,00

\bar{X} =	58,46	-----	22,06	-----	0,00	-----	19,48
D E =	4,23	-----	3,46	-----	0,00	-----	3,45
C V =	7,23	-----	15,68	-----	0,00	-----	17,71

El mismo suero después de 6 días en nevera a 4°C

1	64,00	20,70	0,00	14,00
2	60,10	18,80	0,00	15,40
3	65,10	17,80	0,00	14,60
4	53,50	16,50	0,00	19,00
5	56,30	15,30	0,00	19,00
6	57,10	16,50	0,00	19,90
7	64,80	23,00	0,00	18,90
8	66,80	24,70	0,00	17,90
9	65,00	25,50	0,00	18,50
10	63,30	20,30	0,00	18,90
11	62,00	24,50	0,00	19,20
12	61,20	22,00	0,00	18,10
\bar{X} =	61,60	20,46	0,00	17,78
D E =	4,11	3,52	0,00	1,97
C V =	6,67	17,20	0,00	11,07

El mismo suero después de 9 días en nevera a 4°C

1	80,50	3,60	0,00	14,60
2	80,20	3,80	0,00	14,10
3	84,30	5,30	0,00	14,90
4	85,20	4,40	0,00	14,00
5	84,40	8,00	0,00	13,20
6	81,00	7,80	0,00	9,30
7	81,50	8,00	0,00	10,60
8	80,30	5,80	0,00	10,50
9	82,20	6,00	0,00	11,20
10	83,60	5,70	0,00	10,00
11	85,60	6,90	0,00	11,90
12	87,10	7,70	0,00	12,50
\bar{X} =	82,99	6,09	0,00	12,23
D E =	2,34	1,61	0,00	1,92
C V =	2,81	26,48	0,00	15,69

En estos últimos ensayos se observa que algunas fracciones electroforéticas son inestables a 4°C, llegando incluso a desaparecer y como la actividad enzimática en las bandas se expresa en forma porcentual, las otras fracciones aparecen aumentadas o bien alteradas con respecto a la inicial. Estas variaciones en las bandas prosiguen en los geles al transcurrir el tiempo en magnitud sensiblemente superior, en algunas fracciones, a la variabilidad debida a la densitometría y debe atribuirse a cambios experimentados en las isoenzimas en el suero durante su permanencia en nevera. Por tanto, se puede inferir que para la determinación de las isoenzimas de la fosfatasa alcalina deben prepararse los geles lo más pronto posible.

5. **RESULTADOS EXPERIMENTALES**
=====

5. RESULTADOS EXPERIMENTALES

=====

El estudio de las isoenzimas de la fosfatasa alcalina se ha llevado a cabo en un número relativamente elevado de muestras, acentuándose en individuos normales para que sirva de base a la técnica que se propone en este trabajo.

El principal esfuerzo se ha orientado a la identificación de las bandas electroforéticas, su posición y actividad enzimática, en el espectro del gel tanto en sueros como en homogenados de órganos.

La mayor dificultad se ha encontrado en situar las diversas bandas para hallar analogías y diferencias en las densitometrías de los geles, ya que el desplazamiento de la banda de mayor movilidad, la anódica, variaba desde 4 a 8,8 cm., debido principalmente a la imposibilidad experimental de reproducción de condiciones operatorias en la electroforesis y sobre todo en la densitometría. Lo anterior, se ha solucionado, en parte, normalizando todas las densitometrías, expresando en tantos por ciento de recorrido de cada banda con relación al punto de aplicación de la muestra y a la banda de mayor movilidad. Se ha supuesto que la distancia recorrida por cada banda es proporcional al recorrido de la banda de mayor movilidad con independencia de las porosidades del gel.

Con este criterio se han elaborado los protocolos que figuran en el anexo. En dichos protocolos aparecen columnas correspondientes al número de la muestra, identificación de la misma, sexo y edad, grupo sanguíneo, recorrido de la banda anódica, posición de cada banda en forma porcentual del recorrido, con la actividad enzimática en tantos por ciento. En otros protocolos, se

consignan columnas para enfermedades, órganos ensayados, inhibidores empleados, etc.

En los sueros normales se han estudiado diferencias respecto a la variabilidad del recorrido de la banda anódica, actividad fosfatásica total y según el número de bandas, posición más frecuente de las bandas y actividades enzimáticas de las mismas, sexo, edad y grupo sanguíneo.

5.1. SUEROS NORMALES

La casuística de sueros normales comprende 525 muestras de sujetos procedentes del Servicio de Medicina Preventiva de la Ciudad Sanitaria de la Seguridad Social "1° de Octubre" y de donantes del Banco de Sangre de la misma. El muestreo abarca una población relativamente joven y considerada supuestamente sana.

En la distribución de frecuencias, para la posición de las bandas, se ha elegido un intervalo del 4 por ciento del recorrido de la banda anódica, con la finalidad de hacer patente pequeñas preferencias posicionales de las bandas.

La serie inicial ha sido depurada eliminando aquellos casos cuya frecuencia, en dicho intervalo, era inferior al 2 por ciento ya que cuando se consideran las áreas de las bandas, o sea la actividad enzimática, un valor anormal puede influir significativamente y dar lugar a que no se reflejen los valores medios. La serie depurada quedó reducida a 495 casos.

Variabilidad del recorrido de la banda anódica

Como ya se ha indicado anteriormente, el recorrido de la banda anódica en la densitometría oscilaba entre 4 y 8,8 cm. En

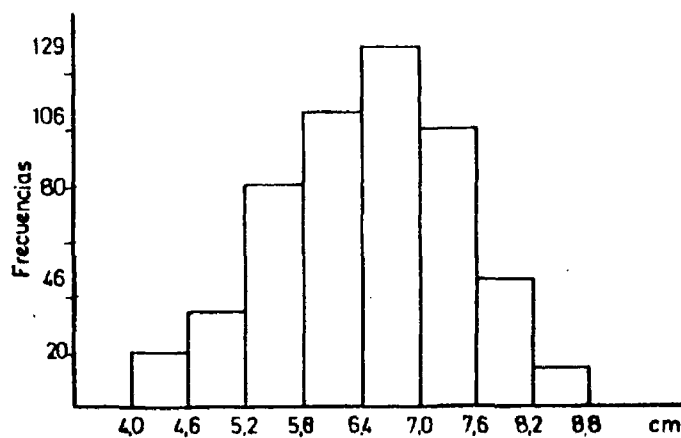
la siguiente tabla se muestra los resultados en el intervalo elegido de 0,6 cm.:

Distribución de frecuencias del recorrido de la banda anódica en la densitometría del gel

Extremos de los intervalos, cm.	Frecuencias	Frecuencias relativas x 100
4,0 - 4,6	20	3,81
4,6 - 5,2	34	6,48
5,2 - 5,8	80	15,24
5,8 - 6,4	106	20,19
6,4 - 7,0	129	24,57
7,0 - 7,6	97	18,48
7,6 - 8,2	46	8,76
8,2 - 8,8	13	2,48
	525	100,01

$\bar{x} = 6,356$ cm.
SD = 0,978
CV = 15,38%

Frecuencia del recorrido de la banda anódica



Puede observarse que el recorrido de la banda anódica se encuentra con mayor frecuencia entre 5,8 y 7,6 cm.

Número de bandas en el gel

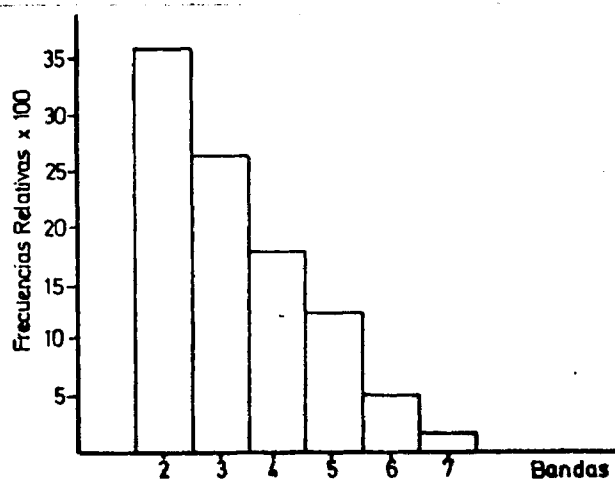
En el gel, después de la electroforesis y revelado, de cualquier suero, aparecen siempre por lo menos dos bandas, una más pequeña que no presenta movilidad, situada en el punto de aplicación del suero en el gel, es decir, en la zona catódica del mismo y otra banda móvil, de mayor tamaño, en la parte anódica.

Además de éstas dos bandas, pueden observarse otras en posiciones intermedias en número variable. Se han encontrado hasta ocho bandas. En la densitometría, algunas bandas aparecen como hombros de otras bandas de mayor área. En la casuística presentada en este trabajo de 525 sueros normales, el número de bandas observadas es el siguiente:

Distribución de frecuencias según el número de bandas

<u>N° de bandas</u>	<u>Frecuencia</u>	<u>Frec. rel.x100</u>
2	189	36,0
3	140	26,6
4	94	17,9
5	65	12,3
6	26	4,9
7	9	1,7
8	2	0,3
	<hr/> 525	

Frecuencia relativa x 100 y número de bandas



Si se consideran únicamente los sueros con 2 y 3 bandas entonces comprenden el 63% de la totalidad. Si además se incluyen los geles con 4 bandas, el porcentaje de sueros alcanza el 81% de la totalidad. Los geles con 7 y 8 bandas deben considerarse, como muy poco frecuentes.

Ajuste a una curva del número de bandas en los geles

En el diagrama anterior se observa que cuando el número de bandas en los geles aumenta, la frecuencia de estos disminuye. Por si la distribución de frecuencias obedeciera a una ley determinada, se ha ajustado la distribución a varios tipos de curvas, por el método de los mínimos cuadrados, con el siguiente resultado:

Tipo de curva	Coef. correl. r	Constantes		
		a	b	c
$y = a + bx$	-0,9759	-234,11	-31,82	-
$y = a \cdot x^b$	-0,8874	-3199,20	-2,96	-
$y = a \cdot b^x$	-0,9574	1373,20	0,48	-
$1/y = a + bx$	-0,7329	-0,21	0,06	-
$y = a + x^b$	-0,9962	-290,86	-328,10	-
$y = a + bx + cx^2$	0,9986	317,85	-71,70	3,99

Donde

y = frecuencia relativa x 100

x = número de bandas en el gel

Variabilidad de la actividad enzimática general y según número de bandas

La actividad enzimática de la fosfatasa alcalina, en la población estudiada de sueros normales, según el procedimiento de Bessey-Lowry, varía dentro de los límites aceptados como normales. En este trabajo se ha considerado de interés conocer si la distribución de la actividad fosfatásica en las diversas bandas difieren entre sí y con respecto a la muestra general.

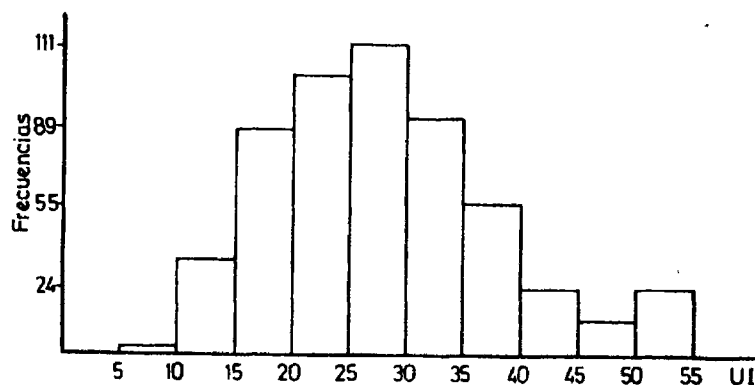
Como intervalo en la distribución se ha tomado 5 unidades internacionales.

Distribución general de frecuencias de la actividad fosfatásica en sueros normales

Extremos de los intervalos, UI	Frecuencias	Frecuencias relativas x 100
5 - 10	1	0,19
10 - 15	33	6,28
15 - 20	81	15,43
20 - 25	98	18,67
25 - 30	111	21,14
30 - 35	84	16,00
35 - 40	55	10,48
40 - 45	24	4,57
45 - 50	13	2,48
> 50	25	4,76
	525	100,00

$\bar{x} = 30 \text{ UI}$
 $DS = 10 \text{ "}$
 $CV = 33\%$

Actividad fosfatásica de sueros normales



La distribución de frecuencias de la actividad fosfatásica de los sueros normales en el intervalo de 5 U.I. no resulta ser del tipo de Gauss, se encuentran valores superiores a 50 UI con una frecuencia mayor que la correspondiente a una distribución normal. Posiblemente se trata de sueros de sujetos que no deben considerarse como normales.

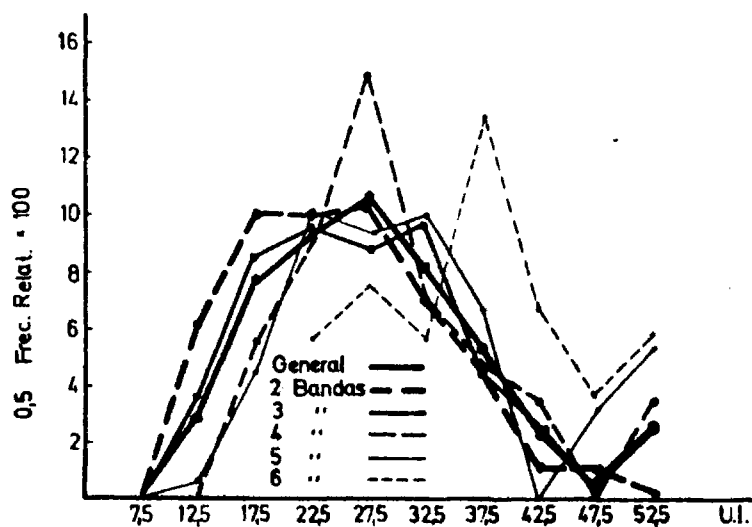
Teniendo en cuenta el número de bandas en los sueros normales, y el mismo intervalo de 5 UI, la actividad fosfatásica, se reparte como se muestra en la siguiente tabla:

Distribución de frecuencias de la actividad fosfatásica según el número de bandas

Extrm. intv.UI	Frecuencias y frecuencias relativas											
	2 bandas		3 bandas		4 bandas		5 bandas		6 bandas		7 bandas	
	F.	F.R.	F.	F.R.	F.	F.R.	F.	F.R.	F.	F.R.	F.	F.R.
5 - 10	-	-	1	0.071	-	-	-	-	-	-	-	-
10 - 15	23	0.122	8	0.571	1	0.106	1	0.154	-	-	-	-
15 - 20	38	0.201	24	0.171	11	0.117	6	0.923	-	-	-	-
20 - 25	37	0.196	27	0.193	17	0.181	13	0.200	3	0.115	1	0.111
25 - 30	39	0.206	25	0.179	28	0.298	12	0.185	4	0.154	2	0.222
30 - 35	26	0.137	27	0.193	13	0.138	13	0.200	3	0.115	1	0.111
35 - 40	17	0.090	13	0.093	9	0.096	9	0.139	7	0.269	-	-
40 - 45	4	0.021	6	0.043	7	0.075	-	-	4	0.154	3	0.333
45 - 50	4	0.021	2	0.014	1	0.011	4	0.062	2	0.077	-	-
> 50	1	0.053	7	0.050	7	0.075	7	0.108	3	0.115	-	-
	198	1.-	140	1.-	94	1.-	65	1.0	26	1.-	9	1.-
	$\bar{x}= 25$ UI		$\bar{x}= 27$ UI		$\bar{x}= 30$ UI		$\bar{x}= 31$ UI		$\bar{x}= 36$ UI		$\bar{x}= 30$ UI	
	DS= 6 "		DS= 10 "		DS= 10 "		DS= 11 "		DS= 10 "		DS= 9 "	
	CV= 24%		CV= 37%		CV= 33%		CV= 35%		CV= 22%		CV= 30%	

Las anteriores distribuciones de frecuencias representadas conjuntamente en un histograma de marcas de clase, con excepción de 7 y 8 bandas ya que sus fracciones son muy pequeñas, proporciona el siguiente

Frecuencias relativas x 100 respecto a marcas de clase



De la distribución anterior se puede inferir que a medida que aumenta el número de bandas, a) la media de la actividad fosfatásica se desplaza hacia valores más altos, b) el porcentaje de sueros con valores superiores a 50 UI, asimismo, aumenta.

5.1.1. Posición de las bandas en el gel de los sueros normales

La actividad fosfatásica total del suero, en la electroforesis, se distribuye ocupando regiones en forma de bandas en el gel de acuerdo a las características físico-químicas de las fracciones enzimáticas de la fosfatasa alcalina.

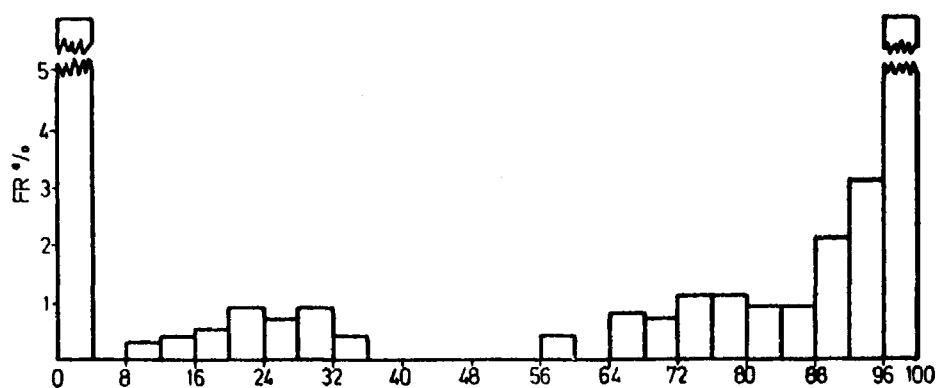
Considerados como un conjunto todos los sueros normales, las bandas, en los geles, se colocan en determinados lugares preferenciales. Como hipótesis de trabajo se ha supuesto que en el espectro de bandas del gel, siempre se hallan presentes dos fracciones enzimáticas de la fosfatasa alcalina en los sueros normales, ambas de procedencia hepática, y situadas en los extremos anódico y catódico. Esta hipótesis, como se verá más adelante, creemos es justificada.

En los 495 sueros depurados y con un intervalo del 4% del recorrido de la banda de mayor movilidad, las bandas se colocan según la distribución de frecuencias siguientes:

Distribución de frecuencias de bandas en sueros normales

Extrem. interv.	Frecuencia	Frecuencia rel. x 100	Extrem. interv.	Frecuencia	Frecuencia rel. x 100
0 - 4	495	30,70	52 - 56	16	0,99
4 - 8	0	0	60 - 64	13	0,80
8 - 12	13	0,80	64 - 68	31	1,92
12 - 16	15	0,93	68 - 72	27	1,67
16 - 20	21	1,30	72 - 76	43	2,66
20 - 24	37	2,23	76 - 80	44	2,72
24 - 28	27	1,67	80 - 84	37	2,23
28 - 32	35	2,16	84 - 88	38	2,35
32 - 36	17	1,05	88 - 92	85	5,27
36 - 40	0	0	92 - 96	126	7,83
40 - 44	0	0	96 - 100	495	30,70
44 - 48	0	0			
48 - 52	0	0			
				1.615 bandas	100

Distribución de frecuencias y posición de bandas



Para la descripción de la posición de las bandas, se divide el recorrido de la banda anódica en tres partes, llamando al primer tercio del gel al más próximo al cátodo, otro intermedio y tercio final anódico, los cuales se corresponden aproximadamente a las tres posiciones del gel.

En el diagrama se observa un grupo de bandas situadas en el primer tercio del recorrido netamente separadas de las de mayor movilidad.

Otro grupo de bandas se sitúan en la zona de unión de los geles de porosidades 7 y 9, y finalmente un último grupo, de gran frecuencia, se coloca en las proximidades de la banda anódica.

Posición de las bandas en geles de tres bandas

Con fines comparativos entre sueros normales y patológicos es de interés conocer los modelos de distribución de frecuencias de las bandas con relación al número de éstas. Un suero patológico, por ejemplo, de cuatro bandas, razonablemente debe compararse con el modelo de suero normal también de cuatro bandas.

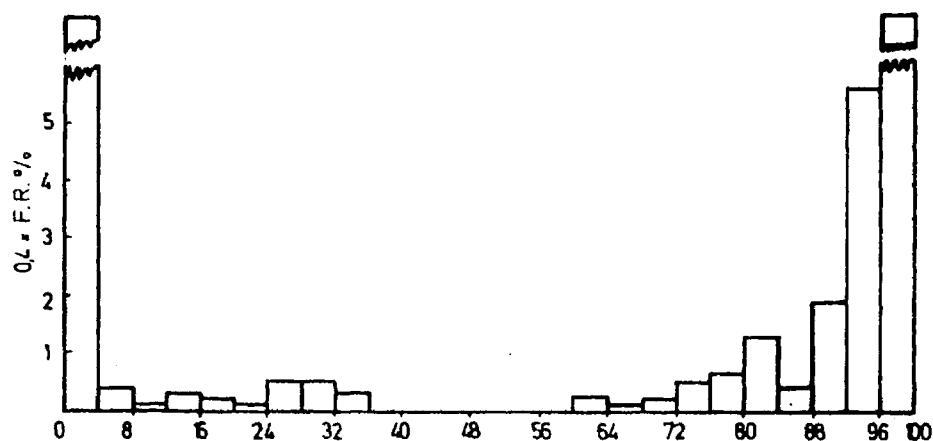
Para la frecuencia posicional de las bandas, se sigue el mismo criterio que en la tabla general.

La muestra de sueros normales con tres bandas es de 140 casos. La banda intermedia se sitúa con arreglo a la siguiente

Posición de la banda intermedia en geles con 3 bandas

<u>Extrem.</u> <u>interv.</u>	<u>Frecuencia</u>	<u>Frecuencia</u> <u>rel. x 100</u>	<u>Extrem.</u> <u>interv.</u>	<u>Frecuencia</u>	<u>Frecuencia</u> <u>rel. x 100</u>
0 - 4	140	33,36	52 - 56	0	0
4 - 8	4	0,95	56 - 60	0	0
8 - 12	1	0,23	60 - 64	2	0,47
12 - 16	3	0,71	64 - 68	1	0,23
16 - 20	2	0,47	68 - 72	2	0,47,
20 - 24	1	0,23	72 - 76	5	1,19
24 - 28	6	1,42	76 - 80	7	1,66
28 - 32	5	1,19	80 - 84	14	3,33
32 - 36	3	0,71	84 - 88	4	0,95
36 - 40	0	0	88 - 92	20	4,77
40 - 44	0	0	92 - 96	60	14,30
44 - 48	0	0	96 -100	140	33,36
48 - 52	0	0		420 B.	100

Posición de la banda intermedia en geles de 3 bandas



La distribución de frecuencias y el diagrama muestran que la banda intermedia se sitúa preferentemente en las proximidades de la banda anódica. Asimismo, puede señalarse la aparición de una banda netamente diferenciada que se coloca al principio del tercio final.

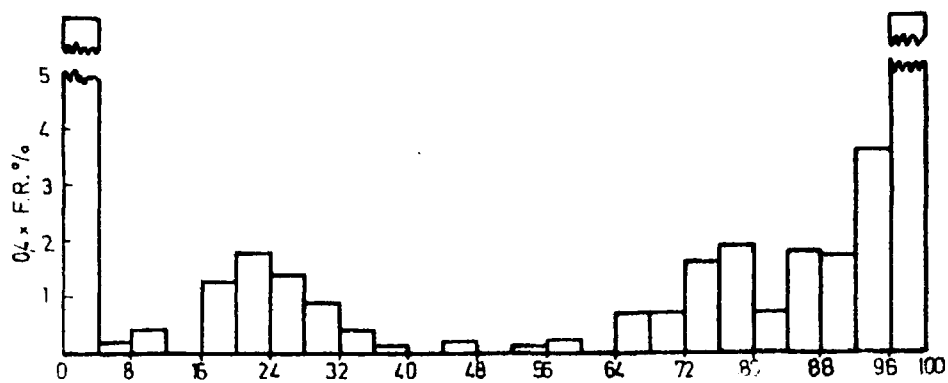
Posición de las bandas en geles de cuatro bandas

Los sueros normales con cuatro bandas ascienden a 94. Las dos bandas intermedias se distribuyen como se muestra a continuación:

Posición de las bandas en geles con 4 bandas

Extrem. interv.	Frecuencia	Frecuencia rel. x 100	Extrem. interv.	Frecuencia	Frecuencia rel. x 100
0 - 4	94	25,00	52 - 56	1	0,26
4 - 8	2	0,53	56 - 60	2	0,53
8 - 12	4	1,06	60 - 64	0	0
12 - 16	0	0	64 - 68	7	1,86
16 - 20	12	3,19	68 - 72	7	1,86
20 - 24	17	4,42	72 - 76	15	3,98
24 - 28	13	3,45	76 - 80	18	4,68
28 - 32	9	2,39	80 - 84	7	1,86
32 - 36	4	1,06	84 - 88	17	4,52
36 - 40	1	0,26	88 - 92	16	4,25
40 - 44	0	0	92 - 96	34	9,04
44 - 48	2	0,53	96 - 100	94	25,00
48 - 52	0	0		376 B.	100

Posición de las bandas en geles de 4 bandas



En esta distribución de frecuencias, con cuatro bandas, se destaca la presencia de bandas en el primer tercio del gel en cantidad superior a la anterior distribución. Puede señalarse, también, tres grupos de bandas situadas al principio del tercio final.

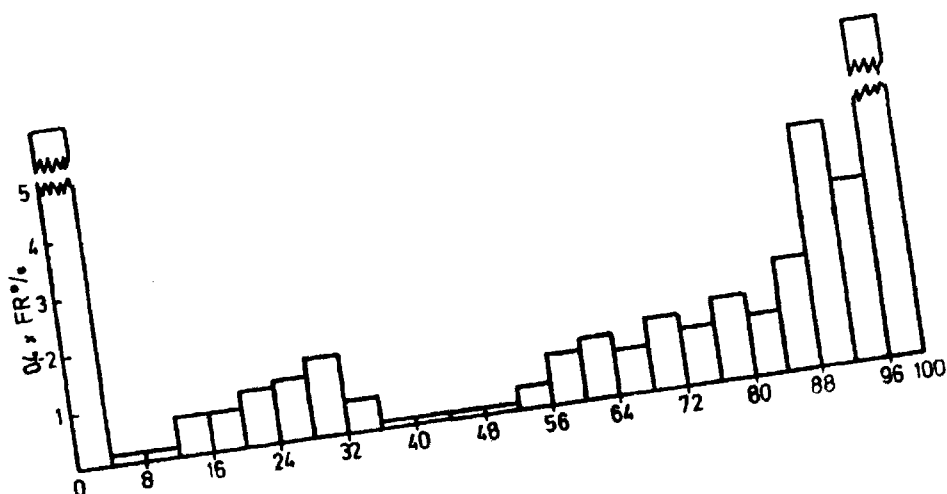
Posición de las bandas en geles con cinco bandas

Comprenden 65 sueros normales. Sus bandas intermedias se sitúan en el gel según la siguiente frecuencia:

Posición de las bandas en geles con 5 bandas

<u>Extrem. interv.</u>	<u>Frecuencia</u>	<u>Frecuencia rel. x 100</u>	<u>Extrem. interv.</u>	<u>Frecuencia</u>	<u>Frecuencia rel. x 100</u>
0 - 4	65	20,03	52 - 56	3	0,92
4 - 8	2	0,61	56 - 60	7	2,15
8 - 12	2	0,61	60 - 64	9	2,76
12 - 16	6	1,84	64 - 68	6	1,84
16 - 20	6	1,84	68 - 72	11	3,38
20 - 24	8	2,46	72 - 76	8	2,46
24 - 28	9	2,76	76 - 80	12	3,69
28 - 32	11	3,38	80 - 84	9	2,76
32 - 36	5	1,54	84 - 88	16	4,92
36 - 40	1	0,30	88 - 92	35	10,76
40 - 44	1	0,30	92 - 96	26	8,00
44 - 48	1	0,30	96 - 100	65	20,06
48 - 52	1	0,30		325 B.	100

Posición de las bandas en geles con 5 bandas



La distribución y diagrama de los geles con 5 bandas es muy parecida a la de los geles con 4 bandas, únicamente puede hacerse notar una frecuencia de bandas, relativamente elevada, en la zona del 88 al 92% del recorrido de la banda anódica

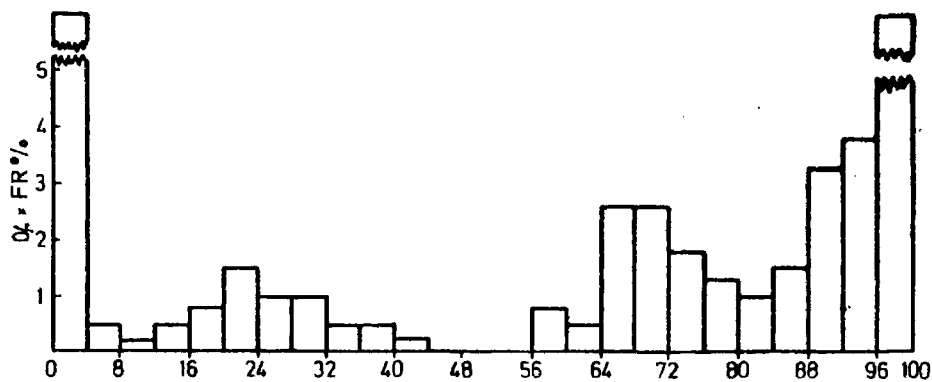
Posición de las bandas en geles con 6 bandas

El número de casos con 6 bandas en la población de sueros normales es de 26. Representan, aproximadamente, el 5% de la totalidad. Las bandas se distribuyen en la forma siguiente:

Posición de las bandas en geles con 6 bandas

Extrem. interv.	Frecuencia	Frecuencia rel. x 100	Extrem. interv.	Frecuencia	Frecuencia rel. x 100
0 - 4	26	16,70	52 - 56	0	0
4 - 8	2	1,28	56 - 60	3	1,92
8 - 12	1	0,64	60 - 64	2	1,28
12 - 16	2	1,28	64 - 68	10	6,41
16 - 20	3	1,92	68 - 72	10	6,41
20 - 24	6	3,84	72 - 76	7	4,48
24 - 28	4	2,56	76 - 80	5	3,20
28 - 32	4	2,56	80 - 84	4	2,56
32 - 36	2	1,28	84 - 88	6	3,84
36 - 40	2	1,28	88 - 92	13	8,33
40 - 44	1	0,64	92 - 96	15	9,61
44 - 48	0	0	96 - 100	26	16,70
48 - 52	0	0		156 B.	100

Posición de las bandas con geles con 6 bandas



Aún cuando el número de casos es relativamente pequeño, puede indicarse que el grupo de bandas situadas en el primer tercio del gel se acentúan algo más que en las distribuciones anteriores, así como que el grupo de bandas presente en la zona de contacto de los geles de porosidades 7 y 9 destacan marcadamente.

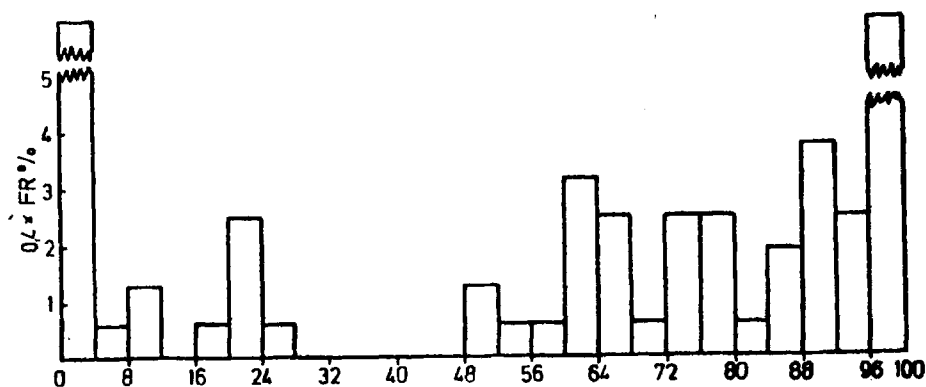
Posición de las bandas en geles con 7 bandas

Los geles con 7 y 8 bandas forman grupos con 9 y 2 casos en 525 sueros normales, por tanto, su incidencia es muy pequeña, 1,7 y 0,3% respectivamente, es decir, su presencia en sueros normales es rara. No obstante, en bastantes sueros patológicos se observan geles con un número elevado de bandas, sobre todo geles con 7 bandas, ello, hace que pueda ser de interés mostrar su distribución.

Posición de las bandas en geles con 7 bandas

Extrem. interv.	Frecuencia	Frecuencia rel. x 100	Extrem. interv.	Frecuencia	Frecuencia rel. x 100
0 - 4	9	14,35	52 - 56	1	1,58
4 - 8	1	1,58	56 - 60	1	1,58
8 - 12	2	3,17	60 - 64	5	7,93
12 - 16	0	0	64 - 68	4	6,34
16 - 20	1	1,58	68 - 72	1	1,58
20 - 24	4	6,34	72 - 76	4	6,34
24 - 28	1	1,58	76 - 80	4	6,34
28 - 32	0	0	80 - 84	1	1,58
32 - 36	0	0	84 - 88	3	4,76
36 - 40	0	0	88 - 92	6	9,52
40 - 44	0	0	92 - 96	4	6,34
44 - 48	0	0	96 - 100	9	14,35
48 - 52	2	3,17		63 B.	100

Posición de las bandas en geles con 7 bandas



En los geles con 7 bandas, a pesar de su reducido número de casos, se observa que las bandas se sitúan en las mismas posiciones que en los geles con un número menor de bandas, siendo su imagen muy semejante. Puede señalarse, sin embargo, una disminución de bandas en las proximidades de la anódica.

Los geles con 8 bandas, que se encuentran en la muestra de

sueros normales, creemos no deben tenerse en cuenta; aparte de la cuestión de que si se deben considerar normales o no, dado su muy pequeño número, 2 casos, de su estudio no se puede extraer ninguna conclusión respecto a la distribución de la frecuencia de bandas.

5.1.2. Actividad fosfatásica en los geles de los sueros normales

La actividad enzimática fosfatásica total del suero es el resultado de la suma de las actividades de las diversas fracciones enzimáticas que lo componen, es decir, de sus isoenzimas. En la electroforesis, cada fracción corre de acuerdo a sus características físico-químicas, y la actividad enzimática total queda resuelta en forma de bandas, y con ello heterogeneidades en la concentración de cada isoenzima en el soporte con las consiguientes perturbaciones en la actividad enzimática, tales como dificultades en el acceso del sustrato a los gradientes de concentración de la enzima en el gel y así como el posterior revelado de los productos originados. Por otra parte, los sustratos para la determinación de la fosfatasa alcalina en el suero y el gel son diferentes. Por tanto, es poco probable que la actividad fosfatásica desarrollada en el gel sea un reflejo exacto, ni siquiera proporcional, de la actividad enzimática del suero.

La actividad enzimática en las bandas de los geles se visualiza por el revelado con 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato y el color resultante de las bandas se determina por densitometría. Según esta técnica, la intensidad del color de cada banda se expresa en porcentaje del área de los picos del espectro obtenido, con respecto a la totalidad.



La actividad fosfatásica en las bandas es desigual. Ciertas bandas presentan una actividad enzimática elevada y otras, en determinadas posiciones, su actividad es pequeña.

En sueros normales, además de la posición más frecuente de las bandas en el gel, interesa conocer la actividad enzimática de las mismas. En este trabajo se hace un estudio en este sentido hallando el valor medio de las actividades fosfatásicas de cada banda, en el intervalo elegido del 4% del recorrido de la banda anódica, en la totalidad de los sueros y clasificados por bandas. Con ello, se pretende hallar unos modelos de espectros que puede ser utilizado en la comparación de sueros patológicos.

En los siguientes cuadros, los encabezamientos de las columnas, significan:

Extrem. interv.: Extremos de los intervalos en tantos por ciento de recorrido.

Frec.: Frecuencia de la distribución.

\bar{x} (AF): Valor medio de la actividad fosfatásica de las bandas en tanto por ciento.

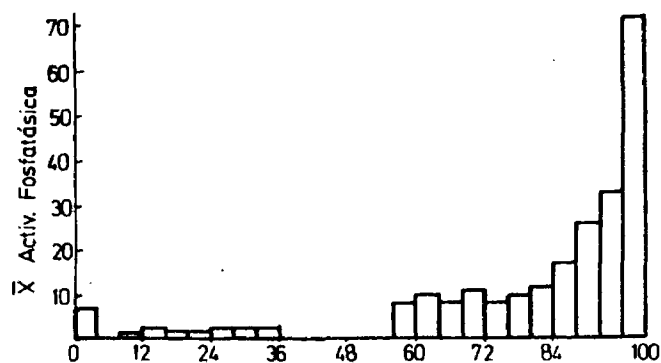
D.S.: Desviación standard del valor medio.

En los diagramas se ha mantenido la misma escala para todas las bandas, de esta forma, su comparación resulta más fácil.

Actividad fosfatásica en las bandas del gel de la muestra

Extrem. interv.	Frec.	\bar{x} (AF)	D.S.	Extrem. interv.	Frec.	\bar{x} (AF)	D.S.
0 - 4	495	7	3	52 - 56	0	0	0
4 - 8	0	0	-	56 - 60	16	8	4
8 - 12	13	2	1	60 - 64	13	10	5
12 - 16	15	3	2	64 - 68	31	9	7
16 - 20	21	2	2	68 - 72	27	11	8
20 - 24	37	2	1	72 - 76	43	8	6
24 - 28	27	3	1	76 - 80	44	10	8
28 - 32	35	3	1	80 - 84	37	11	8
32 - 36	17	3	2	84 - 88	38	17	10
36 - 40	0	0	-	88 - 92	85	26	13
40 - 44	0	0	-	92 - 96	126	33	12
44 - 48	0	0	-	96 - 100	495	72	23
48 - 52	0	0	-				

Valor medio de la actividad fosfatásica en las bandas del gel



Se observa, que la actividad fosfatásica del suero se encuentra localizada principalmente en la zona anódica del gel, que la banda anódica contiene una elevada actividad ($\sim 70\%$), que la banda catódica es pequeña con una actividad unas diez veces menor que la anódica. Las actividades fosfatásicas decrecen a medida que se alejan de la banda anódica. Separadamente y de pequeña magnitud se

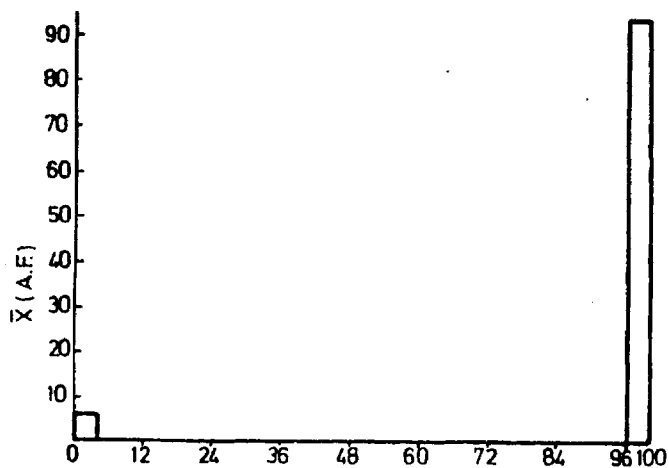
encuentran bandas en el primer tercio del gel.

Es de destacar el alto valor de las desviaciones standards.

Actividad fosfatásica de geles con dos bandas

Forman un grupo de sueros normales de 189. La actividad de ambas bandas es la siguiente:

	<u>Frec.</u>	<u>\bar{x} (AF)</u>	<u>D.S.</u>
Banda catódica	189	6	3
Banda anódica	189	94	3



La anterior tabla muestra que casi la totalidad de la actividad fosfatásica se halla en la banda anódica con la particularidad de presentar muy pequeña variabilidad, C.V. 3%; ambas propiedades constituyen la característica de este grupo.

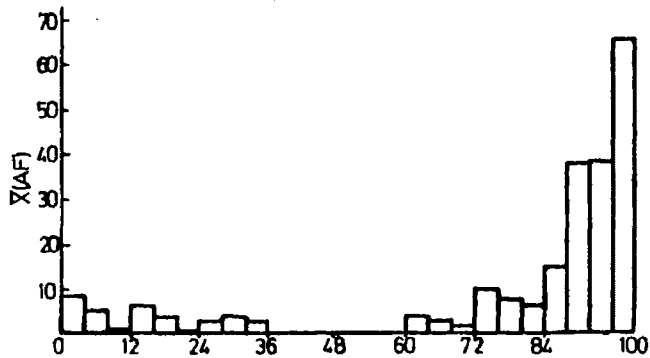
Actividad fosfatásica de geles con 3 bandas

Comprende un grupo de 140 sueros normales. La actividad fosfatásica se distribuye en las bandas en la forma siguiente:

Actividad fosfatásica de geles con 3 bandas

Extrem. interv.	Frec.	$\bar{x}(AF)$	D.S.	Extrem. interv.	Frec.	$\bar{x}(AF)$	D.S.
0 - 4	140	8	3	52 - 56	0	0	-
4 - 8	4	5	4	56 - 60	0	0	-
8 - 12	1	1	-	60 - 64	2	4	-
12 - 16	3	6	3	64 - 68	1	3	-
16 - 20	2	4	2	68 - 72	2	2	2
20 - 24	1	1	-	72 - 76	5	10	9
24 - 28	6	3	2	76 - 80	7	8	2
28 - 32	5	4	1	80 - 84	14	7	5
32 - 36	3	3	1	84 - 88	4	16	6
36 - 40	0	0	-	88 - 92	20	38	12
40 - 44	0	0	-	92 - 96	60	39	11
44 - 48	0	0	-	96 - 100	140	66	19
48 - 52	0	0	-				

Valor medio de la actividad fosfatásica en geles con 3 bandas



La relación entre las actividades enzimáticas de las bandas anódica y catódica se mantiene en proporción análoga a la general, pero con respecto al gel de dos bandas, la banda intermedia

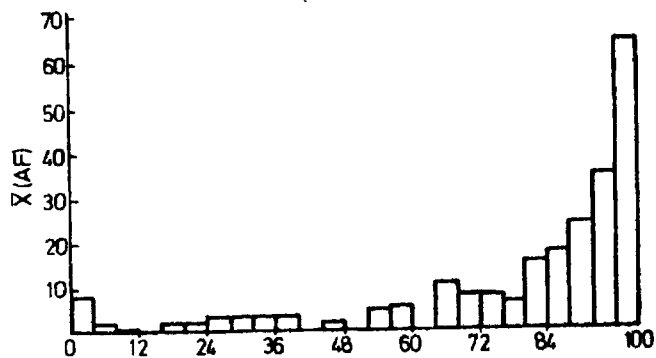
presenta su actividad con mayor frecuencia en la proximidad de la banda anódica. En el resto del gel, pueden aparecer esporádicamente bandas con actividad fosfatásica relativamente pequeña. La dispersión es alta.

Actividad fosfatásica de geles con 4 bandas

Constituye una fracción de 94 sueros normales.

Actividad fosfatásica de geles con 4 bandas							
Extrem. interv.	Frec.	$\bar{x}(AF)$	D.S.	Extrem. interv.	Frec.	$\bar{x}(AF)$	D.S.
0 - 4	94	8	4	52 - 56	1	5	-
4 - 8	2	2	1	56 - 60	2	6	1
8 - 12	4	1	0	60 - 64	0	0	-
12 - 16	0	0	-	64 - 68	7	11	7
16 - 20	12	2	1	68 - 72	7	8	4
20 - 24	17	2	1	72 - 76	15	8	7
24 - 28	13	3	2	76 - 80	18	7	6
28 - 32	9	3	2	80 - 84	7	15	7
32 - 36	4	3	2	84 - 88	17	17	8
36 - 40	1	3	-	88 - 92	16	24	12
40 - 44	0	0	-	92 - 96	34	35	7
44 - 48	2	2	1	96 - 100	94	64	19
48 - 52	0	0	-				

Valor medio de la actividad fosfatásica en geles con 4 bandas



La actividad fosfatásica se localiza en el último tercio del gel, cerca del 90%. Su distribución presenta gran analogía con el diagrama general de sueros normales, pudiéndose señalar una pequeña disminución en la actividad de la banda anódica. La dispersión de los valores medios de la actividad de las bandas es alta.

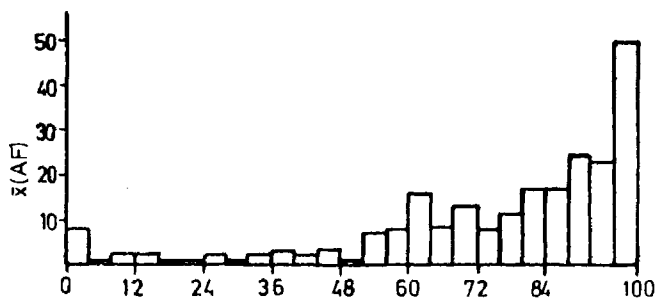
Actividad fosfatásica de geles con 5 bandas

Esta fracción de sueros normales consta de 65 casos, en los cuales, la actividad fosfatásica de sus bandas se encuentra según:

Actividad fosfatásica de geles con 5 bandas

Extrem. interv.	Frec.	$\bar{x}(AF)$	D.S.	Extrem. interv.	Frec.	$\bar{x}(AF)$	D.S.
0 - 4	65	8	4	52 - 56	3	7	2
4 - 8	2	1	0	56 - 60	7	8	3
8 - 12	2	2	1	60 - 64	9	16	6
12 - 16	6	2	1	64 - 68	6	8	4
16 - 20	6	1	0	68 - 72	11	13	10
20 - 24	8	1	1	72 - 76	8	8	6
24 - 28	9	2	1	76 - 80	12	11	7
28 - 32	11	1	1	80 - 84	9	17	11
32 - 36	5	2	1	84 - 88	16	17	8
36 - 40	1	3	-	88 - 92	35	25	9
40 - 44	1	2	-	92 - 96	26	23	8
44 - 48	1	3	-	96 - 100	65	50	21
48 - 52	1	1	-				

Valor medio de la actividad fosfatásica en geles con 5 bandas



En este grupo, aún cuando solo representa el 12,5% de los sueros normales, se observa un desplazamiento de la actividad hacia zonas de la segunda mitad del gel con valores medios muy parecidos. La banda anódica disminuye significativamente de actividad fosfatásica, su media baja al 50% y la banda catódica se mantiene al mismo nivel que en los diagramas precedentes.

Actividad fosfatásica en geles con 6 bandas

Este grupo está integrado de solo 26 sueros normales, 5% del total.

La actividad fosfatásica se reparte de acuerdo a

Actividad fosfatásica de geles con 6 bandas

Extrem. interv.	Frec.	$\bar{x}(AF)$	D.S.	Extrem. interv.	Frec.	$\bar{x}(AF)$	D.S.
0 - 4	26	7	4	52 - 56	0	0	-
4 - 8	2	2	2	56 - 60	3	8	2
8 - 12	1	1	-	60 - 64	2	4	1
12 - 16	2	4	4	64 - 68	10	7	5
16 - 20	3	3	2	68 - 72	10	8	4
20 - 24	6	1	0	72 - 76	7	9	6
24 - 28	4	1	0	76 - 80	5	17	12
28 - 32	4	1	0	80 - 84	4	9	7
32 - 36	2	5	1	84 - 88	6	15	6
36 - 40	2	1	0	88 - 92	13	22	10
40 - 44	1	1	-	92 - 96	15	19	6
44 - 48	0	0	-	96 - 100	26	47	20
48 - 52	0	0	-				

Valor medio de la actividad fosfatásica en geles con 6 bandas



La distribución de la actividad fosfatásica es prácticamente igual que la correspondiente a geles con 5 bandas.

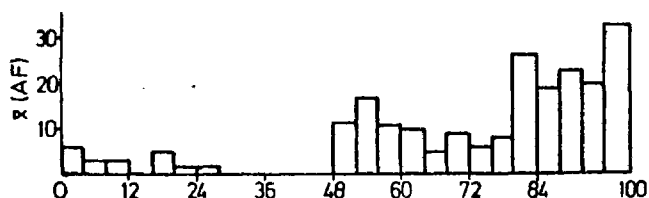
Actividad fosfatásica de geles con 7 bandas

Este grupo está formado por únicamente 9 casos de sueros normales, sólo representa el 1,7%. La actividad fosfatásica se localiza en la siguiente forma:

Actividad fosfatásica de geles con 7 bandas

Extrem. interv.	Frec.	$\bar{x}(AF)$	D.S.	Extrem. interv.	Frec.	$\bar{x}(AF)$	D.S.
0 - 4	9	6	0	52 - 56	1	17	-
4 - 8	1	3	-	56 - 60	1	11	-
8 - 12	2	3	2	60 - 64	5	10	1
12 - 16	0	0	-	64 - 68	4	5	3
16 - 20	1	5	-	68 - 72	1	9	-
20 - 24	4	2	1	72 - 76	4	6	4
24 - 28	1	2	-	76 - 80	4	8	2
28 - 32	0	0	-	80 - 84	1	27	-
32 - 36	0	0	-	84 - 88	3	19	6
36 - 40	0	0	-	88 - 92	6	23	9
40 - 44	0	0	-	92 - 96	4	20	4
44 - 48	0	0	-	96 - 100	9	33	9
48 - 52	2	12	2				

Valor medio de la actividad fosfatásica de geles con 7 bandas



Aún cuando la casuística es muy pequeña, puede señalarse que la actividad fosfatásica se encuentra localizada en la segunda mitad del gel con bandas de actividad enzimática muy parecidas. La banda anódica baja a valores medios del 30%.

En resumen, puede decirse respecto a la distribución de la actividad fosfatásica en las bandas de los geles:

- Gran dispersión de los valores medios de la actividad fosfatásica en las bandas.
- La banda catódica es de pequeña actividad, se mantiene constante en todos los sueros normales, entre 7 y 8%, con independencia del número de bandas.
- La banda anódica contiene el mayor porcentaje de la actividad fosfatásica, es máxima en geles de 2 bandas y su actividad decrece al aumentar el número de bandas.
- La AF en las bandas intermedias se localiza principalmente en el último tercio del gel disminuyendo la actividad en forma decreciente; cuando aumenta el número de bandas la AF se desplaza hacia el centro. Con muchas bandas la AF se sitúa marcadamente en la segunda mitad del gel con valores medios en las bandas muy parecidos.

5.1.3. Influencia del sexo en el espectro electroforético en sueros normales

En la literatura consultada sobre las isoenzimas de la fosfatasa alcalina no se ha encontrado información respecto a la influencia del sexo en relación al número de bandas, posición y actividad fosfatásica de las mismas (KAPLAN, M.D., 1972; CHEN, 1976 y SKILLEW, A.W., 1972) quizás, por no haberse hallado diferencias significativas, con las técnicas analíticas empleadas. Por si con la metodología propuesta en este trabajo pudieran encontrarse algunas diferencias por influencia del sexo, se efectúa el estudio siguiente con los resultados que se indican a continuación.

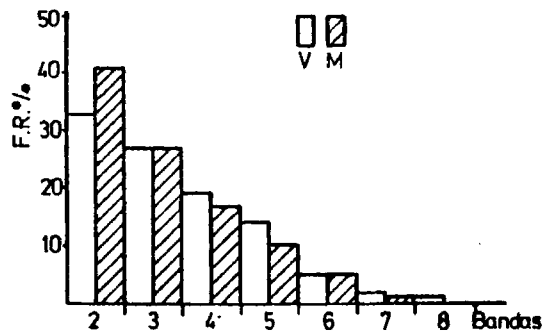
Los 525 sueros normales, sin depurar, se encuentran 321 varones y 204 mujeres, cuyos porcentajes son 61,14 y 38,85 respectivamente. Sus geles, según el número de bandas forman la siguiente distribución:

Frecuencia de bandas en geles de varones y mujeres

<u>Varones</u>			<u>Mujeres</u>		
<u>Bandas</u>	<u>frec.</u>	<u>f.r. x 100</u>	<u>Bandas</u>	<u>frec.</u>	<u>f. r. x 100</u>
2	106	33,05	2	83	40,70
3	85	26,47	3	55	26,96
4	60	18,69	4	34	16,66
5	45	14,01	5	20	9,80
6	16	4,98	6	10	4,90
7	7	2,18	7	2	0,98
8	2	0,62	8	0	0
	321	100		204	100

En el diagrama que se muestra a continuación, en lugar de frecuencias absolutas, se utilizan las frecuencias relativas x 100 para poder comparar ambos sexos. En los demás diagramas se utiliza

el mismo criterio.



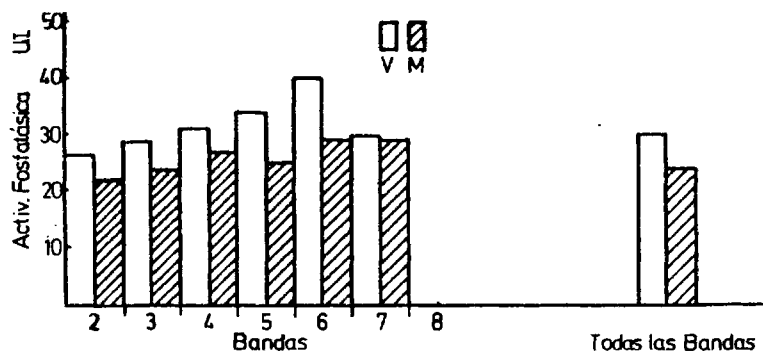
En el cuadro anterior, desde un punto de vista general, puede deducirse que son muy semejantes los geles de varones y de mujeres. Sin embargo, se observa cierta discrepancia en los geles con dos bandas en donde hay un predominio en las mujeres del orden del 17%; por el contrario, en geles con cuatro y cinco bandas predominan ligeramente los varones.

Actividad fosfatásica en sueros normales según sexo

De los 525 sueros normales que constituyen la muestra, las actividades fosfatásicas de los mismos considerando varones y mujeres son las siguientes:

Actividad fosfatásica de sueros normales según sexo						
Bandas	Varones			Mujeres		
	n	\bar{x} (U.I.)	D.S.	n	\bar{x} (U.I.)	D.S.
Todas	321	30	10	204	24	8
Dos	106	27	8	83	22	7
Tres	84	29	11	56	24	8
Cuatro	60	31	10	34	27	9
Cinco	44	34	11	21	25	7
Seis	16	40	9	10	29	8
Siete	7	30	8	2	29	10
Ocho	2	30	3	0	-	-

Actividad fosfatásica de sueros normales según sexo



La actividad fosfatásica de los sueros, determinada por el procedimiento de Besey-Wasser, de varones es francamente superior a la de las mujeres; sus valores medios son de 30 y 24 unidades internacionales respectivamente, con un coeficiente de variabilidad muy semejante en ambos. Esta diferencia de actividad entre varones y mujeres se mantiene cuando se considera el número de bandas en los geles. Por otra parte, el valor medio de la actividad fosfatásica del suero aumenta con el número de bandas, siendo máxima en geles con 6 bandas.

Aplicado el criterio estadístico del "t de Student" a los valores de la fosfatasa alcalina de los sueros normales de los varones y mujeres y teniendo en cuenta que el número de casos es diferente para ambos y por tanto independientes, la expresión a utilizar es:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_x} \quad s_x = \frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2} \quad \frac{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

en donde

<u>Varones</u>	<u>Mujeres</u>
$n_1 = 321$	$n_2 = 204$
$\bar{x}_1 = 30 \text{ UI}$	$\bar{x}_2 = 24 \text{ UI}$
$s_1 = 10 \text{ UI}$	$s_2 = 8 \text{ UI}$

$$t = \frac{30 - 24}{0,8316} = 7,21$$

Valor de "t" muy superior a 2, para el nivel de probabilidad del 95%, indicativo de que la diferencia de las medias, entre varones y mujeres en la actividad fosfatásica del suero normal, es significativa a dicho nivel.

Posición de las bandas en los geles según sexo

Para hacer resaltar diferencias en la posición de las bandas entre varones y mujeres se incluyen en un solo cuadro la frecuencia general de las bandas y en forma separada por número de bandas. No se tienen en cuenta los geles con siete bandas debido a que en mujeres solo hay dos casos.

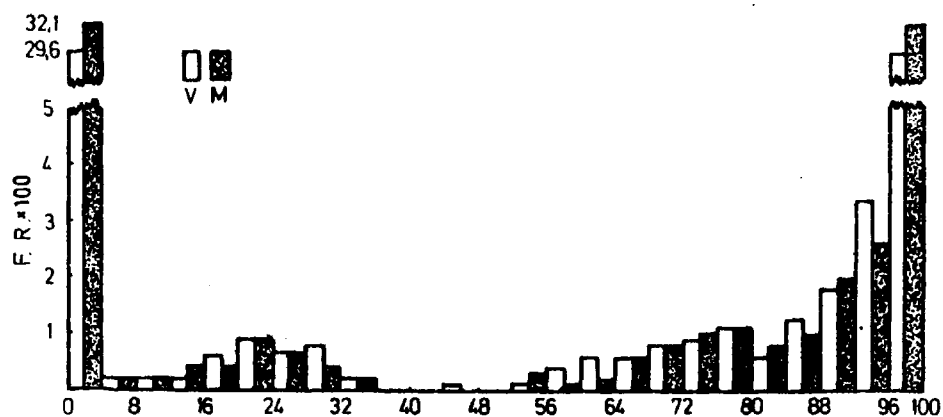
La actividad fosfatásica de las bandas, AF, se expresa en sus valores medios. Se incluye la desviación standard, D.S., de la media, con el solo fin de indicar el grado de dispersión de la AF en la banda. Naturalmente, no tiene ningún valor estadístico. Se emplea el valor 0, en D.S. para señalar que todos los valores de la AF en esa banda tienen el mismo valor; y un guión, en esa casilla, cuando en la correspondiente \bar{x} (AF) solo existe un caso.

En los diagramas, se ha preferido comparar varones y mujeres utilizando barras diferentes, en forma de parejas, en los in-

térvalos de la banda anódica con el propósito de hacer destacar diferencias respecto al sexo, tanto en la posición de las bandas como en el valor medio de la AF.

Para la comparación en la posición de las bandas, se han utilizado las frecuencias relativas x 100 ya que el número de casos es diferente.

Posición de las bandas en geles según sexo. Todas las bandas



Posición de las bandas en gales

Extrem. intv.: Extremos de los intervalos del recorrido
 f.: frecuencia de las bandas
 fr%: frecuencia relativa x 100

Extr.	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96
intv.	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96	100

MUJERES

Todas las bandas

f.	204	4	4	7	7	14	11	7	4	1	1	-	-	5	2	4	9	13	16	18	13	15	31	41	204
fr%	32,1	0,6	0,6	1,1	1,1	2,2	1,7	1,1	0,6	0,1	0,1	-	-	0,8	0,3	0,6	1,4	2,0	2,5	2,8	2,0	2,4	4,9	6,5	32,1

Dos bandas

f.	83																								83
----	----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

Tres bandas

f.	56	2	-	3	-	1	-	1	2	-	-	-	-	-	-	-	1	2	6	7	3	9	15	56
fr%	34,3	1,2	-	1,8	-	0,6	-	0,6	1,2	-	-	-	-	-	-	-	0,6	1,2	3,8	4,3	1,8	5,4	9,0	34,3

Cuatro bandas

f.	34	2	1	-	4	6	7	1	1	1	-	-	-	1	-	-	2	7	7	6	4	3	5	10	34
fr%	25,0	1,5	0,6	-	3,0	4,4	5,1	0,6	0,6	0,6	-	-	-	0,6	-	-	1,5	5,1	5,1	4,4	3,0	3,0	3,6	7,3	25,0

Cinco bandas

f.	21	-	1	4	2	3	2	3	-	-	1	-	-	3	1	3	3	3	4	2	2	8	10	8	21
fr%	20,0	0	1,0	3,8	1,9	2,8	1,9	2,8	-	-	1,0	-	-	2,8	1,0	2,8	2,8	2,8	3,8	1,9	1,9	7,6	9,5	7,6	20,0

Seis bandas

f.	10	-	1	-	-	3	1	2	1	1	-	-	-	2	1	-	5	2	2	4	-	1	7	7	10
fr%	16,7	-	1,7	-	-	5,0	1,7	3,3	1,7	1,7	-	-	-	3,3	1,7	-	8,3	3,3	3,3	6,6	-	1,7	1,6	1,6	16,7

Posición de las bandas en geles

Extrem. intv.: Extremos de los intervalos del recorrido
f.: frecuencia de las bandas
fr%: frecuencia relativa x 100

Extr.	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96
intv.	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96	100

VARONES

Todas las bandas

f.	321	8	6	7	18	25	20	23	7	1	1	3	1	2	11	16	17	21	24	30	17	36	50	93	321
fr%	29,8	0,7	0,5	0,6	1,6	2,3	1,8	2,1	0,6	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	1,0	1,4	1,5	1,9	2,2	2,7	1,5	3,3	4,6	8,6	29,8

Dos bandas

f.	106																								106
----	-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-----

Tres bandas

f.	84	1	1	-	2	1	6	4	1	-	-	-	-	-	2	1	1	4	4	3	1	10	41	84
fr%	33,4	0,4	0,4	-	0,8	0,4	2,4	1,6	0,4	-	-	-	-	-	0,8	0,4	0,4	1,6	1,6	1,2	0,4	4,0	16,3	33,4

Cuatro bandas

f.	60	-	3	-	8	12	5	8	1	1	-	2	-	1	-	1	4	2	7	10	5	15	9	21	60
fr%	26,0	-	1,2	-	3,3	5,0	2,1	3,3	0,5	0,5	-	0,8	-	0,5	-	0,5	1,7	0,5	2,9	4,2	2,1	6,2	3,7	8,7	26,0

Cinco bandas

f.	44	2	-	3	5	6	6	8	4	1	-	1	1	1	5	6	4	7	5	11	5	11	20	19	44
fr%	20,0	0,9	-	1,3	2,3	2,7	2,7	3,6	1,8	0,6	-	0,6	0,6	0,6	2,3	2,7	1,8	3,2	2,3	5,0	2,3	5,0	9,1	8,6	20,0

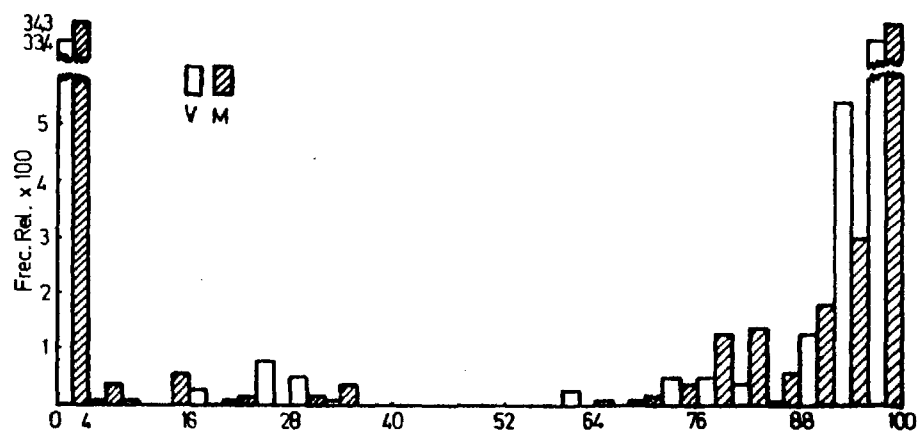
Seis bandas

f.	16	2	-	2	3	3	3	3	-	1	1	-	-	-	2	2	5	8	4	1	4	5	6	9	16
fr%	16,8	2,1	-	2,1	3,1	3,1	3,1	3,1	-	1,0	1,0	-	-	-	2,1	2,1	5,2	8,3	4,1	1,0	4,1	5,2	6,3	9,4	16,8

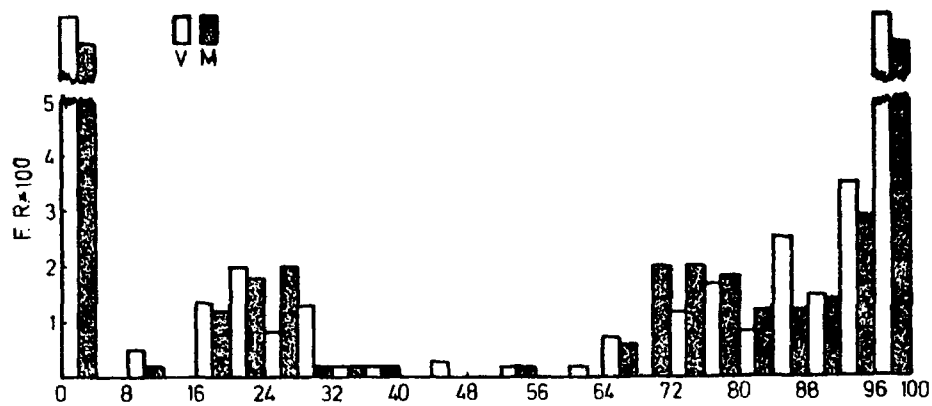
Siete bandas

f.	7	1	1	-	-	3	-	-	-	-	-	-	1	1	1	4	4	1	3	4	-	3	5	3	7
fr%	14,4	2,0	2,0	-	-	6,1	-	-	-	-	-	-	2,0	2,0	2,0	8,2	8,2	2,0	6,1	8,2	-	6,1	10,2	6,1	14,4

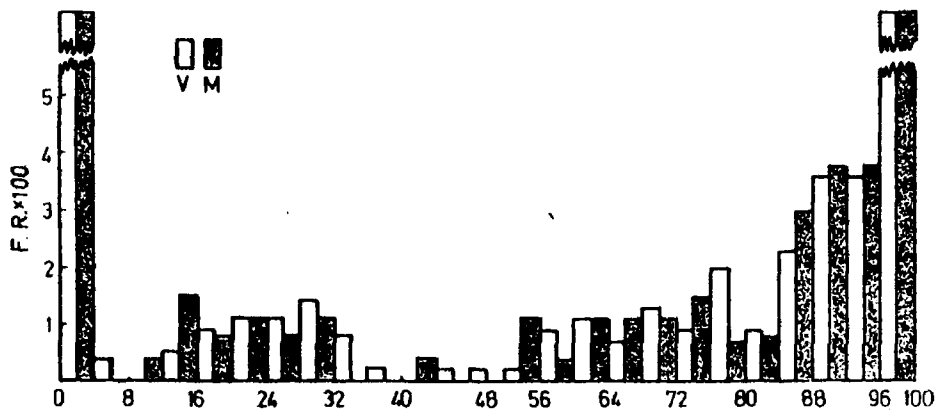
Posición de las bandas en geles según sexo. Tres bandas



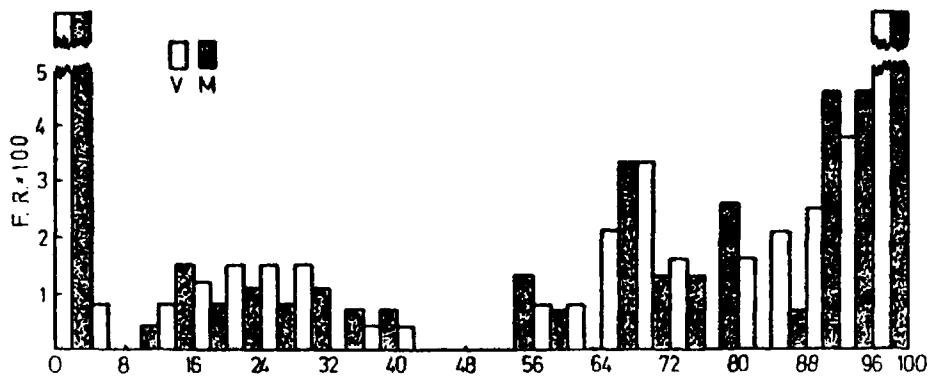
Posición de las bandas en geles según sexo. Cuatro bandas



Posición de las bandas en geles según sexo. Cinco bandas



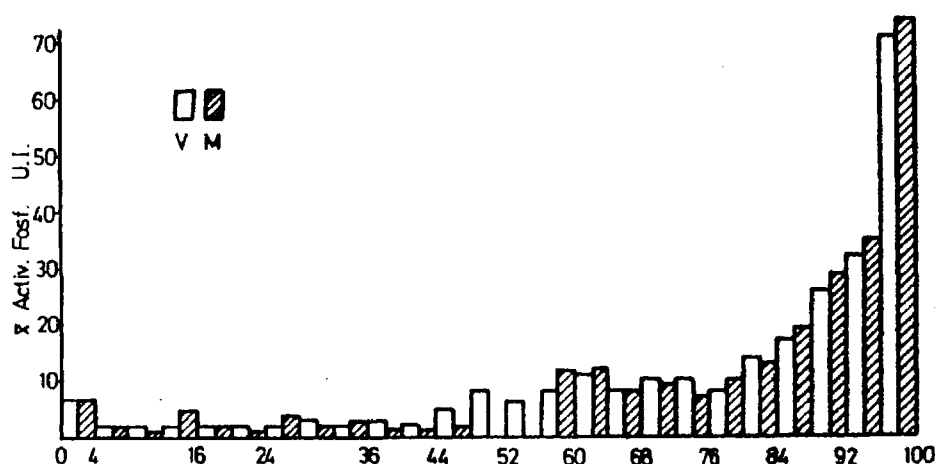
Posición de las bandas en geles según sexo. Seis bandas



El diagrama correspondiente a todas las bandas pone de manifiesto que, en general, no hay posiciones preferenciales entre varones y mujeres, excepto en la banda próxima a la anódica, en donde se aprecia una banda de mayor frecuencia en varones que en mujeres. Lo anterior, queda confirmado en los geles con tres bandas en las que se destaca aún más marcadamente dicha banda en varones en relación a mujeres. A medida que aumenta el número de bandas se va atenuando esta discrepancia respecto al sexo.

En una observación minuciosa de los diagramas puede distinguirse una pequeña preferencia de bandas en la zona de contacto de los geles con porosidades del 7 y 9% en sueros de mujeres.

Actividad fosfatásica en geles normales según sexo. Todas las bandas



Actividad fosfatásica de los geles según sexo

Valor medio de la AF en geles según sexo y número de bandas

Extr. intrv.: Extremos de los intervalos del recorrido de la banda anódica

$\bar{x}(AF)$: Valor medio de la actividad fosfatásica de las bandas

D.S. : Desviación standard de la media de la AF

Extr.	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96
intrv.	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96	100

VARONES

Todas las bandas

$\bar{x}(AF)$	7	2	2	2	2	2	2	3	2	3	2	5	8	6	8	11	8	10	10	8	14	17	26	32	71
D.S.	4	1	1	2	1	1	1	2	1	-	-	1	-	1	4	6	5	7	8	6	9	9	11	11	23

Dos bandas

$\bar{x}(AF)$	6																								94
D.S.	3																								3

Tres bandas

$\bar{x}(AF)$	8	4	1	-	4	1	3	5	2	-	-	-	-	-	4	3	2	15	7	8	7	34	38	66
D.S.	4	-	-	-	2	-	2	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	7	2	6	-	13	11	17

Cuatro bandas

$\bar{x}(AF)$	8	-	1	-	2	2	3	3	3	5	-	2	-	5	-	5	8	2	9	5	16	21	22	33	64
D.S.	4	-	0	-	1	1	1	2	-	-	-	1	-	-	-	-	5	0	8	4	9	11	11	6	20

Cinco bandas

$\bar{x}(AF)$	8	1	-	1	1	1	2	2	2	3	-	3	4	7	8	17	15	12	11	11	22	14	26	23	50
D.S.	4	0	-	0	0	1	0	1	1	0	-	-	-	-	4	5	4	9	9	7	10	5	9	7	21

Seis bandas

$\bar{x}(AF)$	8	2	-	4	3	1	1	1	-	2	1	-	-	-	8	4	9	10	9	23	9	16	25	19	48
D.S.	4	1	-	3	2	0	0	0	-	-	-	-	-	-	2	1	6	5	5	-	6	5	9	6	20

Actividad fosfatásica de los geles según sexo

Valor medio de la AF en geles según sexo y número de bandas

Extr. intrv.: Extremos de los intervalos del recorrido de la banda anódica

$\bar{x}(AF)$: Valor medio de la actividad fosfatásica de las bandas

D.S. : Desviación standard de la media de la AF

Extr.	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96
intrv.	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96	100

MUJERES

Todas las bandas

$\bar{x}(AF)$	7	2	1	5	2	1	4	2	3	1	2	-	-	12	6	12	8	9	7	10	13	19	29	35	74
D.S.	3	2	0	6	1	1	2	1	2	-	-	-	-	11	2	6	7	8	5	9	12	10	13	12	22

Dos bandas

$\bar{x}(AF)$	7																								93
D.S.	3																								3

Tres bandas

$\bar{x}(AF)$	7	3	-	6	-	1	-	4	4	-	-	-	-	-	-	-	2	2	9	7	19	44	44	68
D.S.	3	2	-	3	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	2	5	4	8	8	19

Cuatro bandas

$\bar{x}(AF)$	7	2	1	-	1	1	4	4	1	2	-	-	-	5	-	-	20	8	10	9	26	10	26	35	63
D.S.	3	1	-	-	1	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	5	6	9	13	4	14	13	19

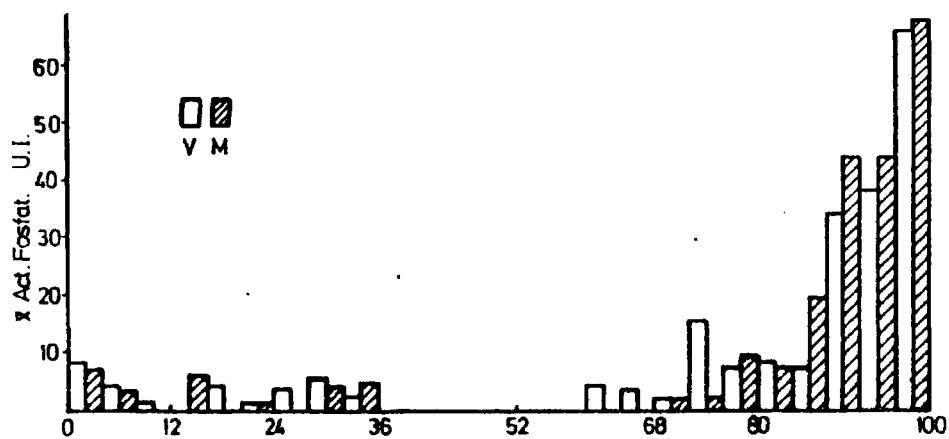
Cinco bandas

$\bar{x}(AF)$	7	-	1	2	1	1	4	1	-	-	2	-	-	8	5	13	5	14	7	4	13	23	22	24	52
D.S.	2	-	-	1	0	0	2	0	-	-	-	-	-	2	-	6	-	14	2	0	10	11	8	9	20

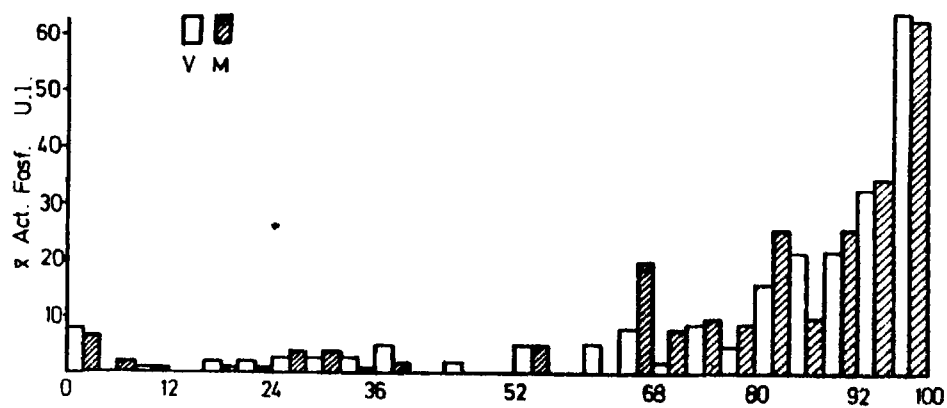
Seis bandas

$\bar{x}(AF)$	6	-	1	-	-	2	2	3	6	1	-	-	-	7	8	-	5	6	6	16	-	11	20	21	43
D.S.	2	-	-	-	-	0	-	1	-	-	-	-	-	2	-	-	3	0	0	12	-	-	9	6	19

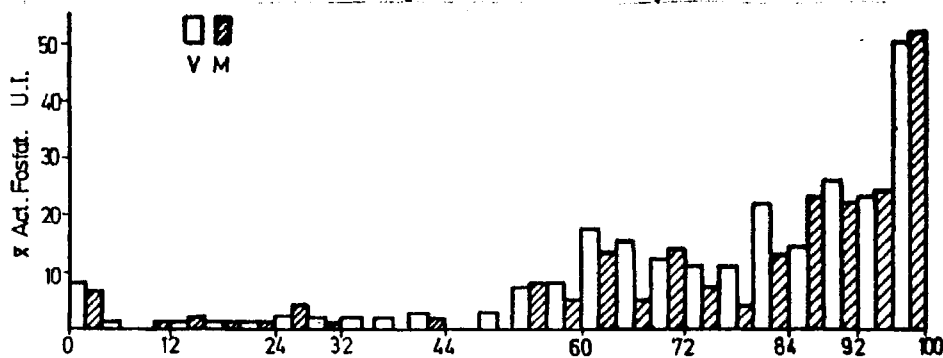
Actividad fosfatásica en geles normales según sexo. Tres bandas



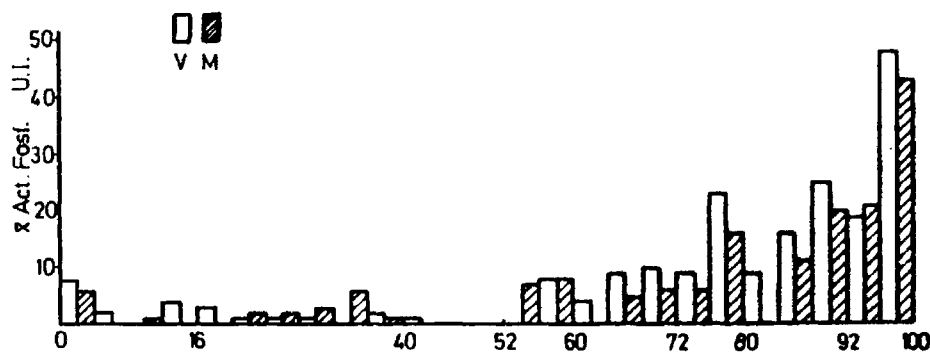
Actividad fosfatásica en geles normales según sexo. Cuatro bandas



Actividad fosfatásica en geles normales según sexo. Cinco bandas



Actividad fosfatásica en geles normales según sexo. Seis bandas



No se aprecian diferencias estimables en el valor medio de la actividad fosfatásica, AF, en los geles, de varones y mujeres en el histograma correspondiente a todas las bandas, asimismo tampoco se pueden considerar significativas las diferencias que aparecen en los diagramas con igual número de bandas entre ambos sexos.

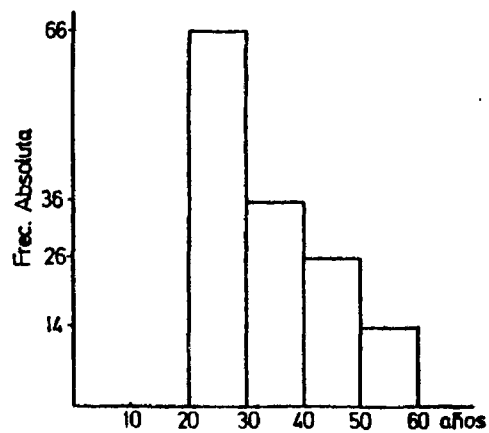
5.1.4. Influencia de la edad en el espectro electroforético en sueros normales

La edad es otro parámetro, que analogamente al sexo, raramente se menciona en los trabajos sobre isoenzimas de la fosfatasa alcalina. Posiblemente se deba a que no se han hallado variaciones que merezcan ser señaladas, o bien, que con las técnicas analíticas empleadas no se pusieran de manifiesto posibles diferencias.

Se ha efectuado un estudio sobre la influencia de la edad en la actividad fosfatásica en sujetos normales tanto en sueros como en geles. De los 525 sueros normales que constituyen la muestra, solo se dispone de 142 sueros con indicación de la edad, todos ellos procedentes del Servicio de Medicina preventiva de la Ciudad Sanitaria "1° de Octubre". Comprende un grupo joven, aún cuando los límites sean de 20 a 55 años. En el presente estudio, el intervalo ha sido establecido en 10 años. La frecuencia de los sueros en cada intervalo se muestra a continuación:

<u>Edad</u>	<u>Frecuencia</u>	<u>Frec. relat. x 100</u>
20 a 30	66	46,48
31 a 40	36	25,36
41 a 50	26	18,30
Mayor de 51	14	9,86
	<u>142</u>	<u>100</u>

Distribución de frecuencias respecto a la edad

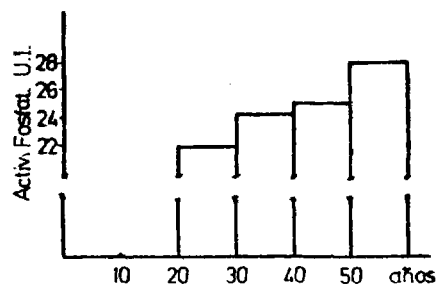


La edad media de esta población es aproximadamente de 35 años.

La actividad fosfatásica de los sueros correspondientes a cada intervalo se muestran a continuación:

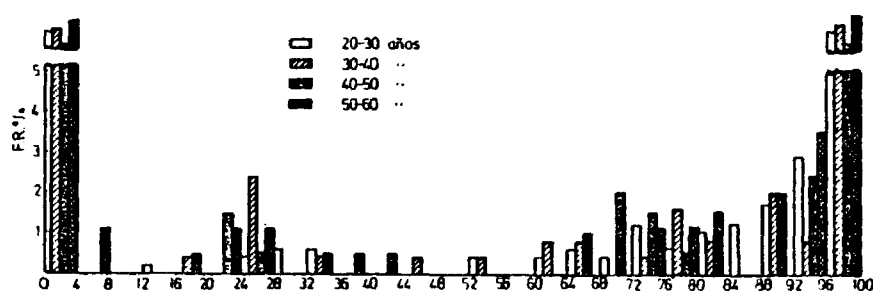
Edad	Frec.	\bar{x}	D.S.
20 a 30	66	22,0	8
31 a 40	36	24,3	10
41 a 50	26	25,6	7
Mayor de 51	14	28,2	11

Actividad fosfatásica de sueros según la edad



Se aprecia que con el aumento de la edad hay un pequeño incremento en la actividad fosfatásica.

Posición de las bandas en geles según la edad



La edad, en general, no da lugar a posiciones preferenciales de las bandas. En una observación detallada puede señalarse, que en la edad comprendida entre 20 y 30 años las posiciones de las bandas es muy semejante al histograma correspondiente a la totalidad de los 525 sueros, que entre 31 a 40 años aparece una mayor densidad de bandas en el primer tercio del gel, y que de los 41 a 50 años hay una mayor proporción de bandas en la zona de contacto de las porosidades de 7 y 9% del gel.

Influencia de la edad en la posición de las bandas en los geles

La distribución de las bandas en geles considerando la edad se muestra en la siguiente tabla:

Posición de las bandas en geles según la edad

Extr. intv.: Extremos de los intervalos del recorrido de la banda anódica

f.: frecuencia de las bandas

fr% : frecuencia relativa x 100

Extr.	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96		
Intv.	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96	100		
<u>20 a 30 años</u>																											
f.	66	-	-	1	-	-	2	3	3	-	-	-	-	2	-	2	3	2	6	3	5	6	8	14	66		
fr%	34,4	-	-	0,5	-	-	1,0	1,6	1,6	-	-	-	-	1,0	-	1,0	1,6	1,0	3,1	1,6	2,6	3,1	4,2	7,3	34,4		
<u>31 a 40 años</u>																											
f.	36	-	-	-	1	-	6	-	1	-	-	1	-	1	-	2	2	-	1	4	2	-	5	2	36		
fr%	36,0	-	-	-	1,0	-	6,0	-	1,0	-	-	1,0	-	1,0	-	2,0	2,0	-	1,0	4,0	2,0	-	5,0	2,0	36,0		
<u>41 a 50 años</u>																											
f.	26	-	-	-	1	3	1	-	1	1	1	-	-	-	-	2	4	3	1	3	-	4	5	26			
fr%	31,7	-	-	-	1,2	3,7	1,2	-	1,2	1,2	1,2	-	-	-	-	2,4	4,9	3,7	1,2	3,7	-	4,9	6,1	31,7			
<u>Mayores de 51 años</u>																											
f.	14	1	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	3	14		
fr%	38,8	2,8	-	-	-	2,8	2,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,8	2,8	-	-	-	8,8	38,8		

Valor medio de la actividad fosfatásica en geles según la edad

La actividad fosfatásica en los geles se distribuye de acuerdo a la siguiente tabla:

Valor medio de la AF en geles según edad y número de bandas

Extr. intv.: Extremos de los intervalos del recorrido de la banda anódica

$\bar{x}(AF)$: Valor medio de la actividad fosfatásica de las bandas

D.S. : Desviación standard del valor medio de la AF

Extr.	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96
Intv.	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96	100

20 a 30 años

$\bar{x}(AF)$	7	-	-	2	-	-	7	2	2	-	-	-	-	5	-	19	14	6	9	12	9	19	35	43	73
D.S.	3	-	-	-	-	-	0	1	1	-	-	-	-	0	-	3	11	5	5	3	5	12	10	15	22

31 a 40 años

$\bar{x}(AF)$	8	-	-	-	3	-	3	-	3	-	-	3	-	7	-	13	15	-	18	9	5	-	37	41	80
D.S.	3	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	3	6	-	-	4	0	-	5	1	19

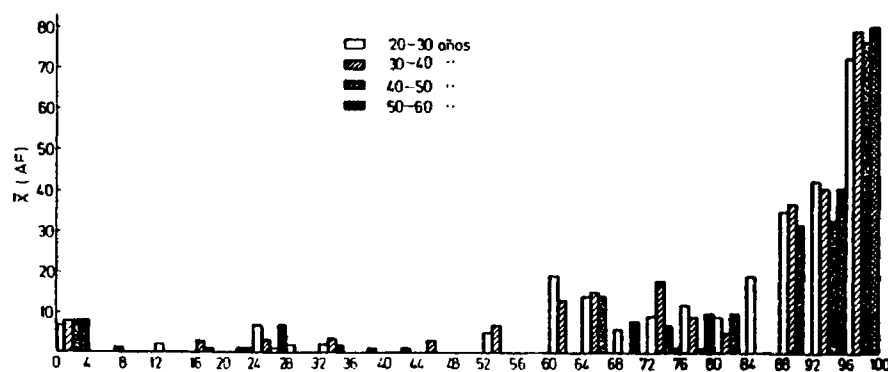
41 a 50 años

$\bar{x}(AF)$	8	-	-	-	1	1	1	-	2	1	1	-	-	-	-	14	8	7	1	10	-	32	33	77
D.S.	4	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	6	7	-	7	-	11	14	20

Mayores de 51 años

$\bar{x}(AF)$	8	1	-	-	-	1	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	10	-	-	-	41	81
D.S.	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	19

DIAGRAMA N° Actividad fosfatásica de las bandas según la edad



La actividad fosfatásica, en los geles, es muy semejante en todas las edades.

5.1.5. Influencia de los grupos sanguíneos en el espectro electroforético de sueros normales

La influencia de los grupos sanguíneos respecto a las isoenzimas de la fosfatasa alcalina ha sido objeto de diversos estudios así como de revisiones de los mismos (WILKISON, 1970; FERNLEY, 1971; CHEN, 1976). Algunos investigadores encuentran que los grupos sanguíneos correspondientes al 0 y B presentan un mayor número de bandas intestinales (ARFORS, 1963; BECKMANN, 1964; SHRE-FLEER, 1966; FISHMAN Y GHOSH, 1967; WARNOCK, 1968; WALKER, 1971; ESBRIT, 1975; BURLINA, 1976; CHEN, 1976), mientras que otros autores este aumento de bandas intestinales la observan en los grupos 0 y A (BAMFORD, 1965; ROBINSON Y GOLDSMITH, 1967; KAPLAN, 1972). Posiblemente, estas diferencias halladas pueden que sean debidas a las diversas metódicas empleadas.

En algunos trabajos se menciona el carácter secretor o no secretor de los individuos y su posible influencia en el número de bandas electroforéticas con actividad fosfatásica por estar relacionado con los grupos sanguíneos (BURLINA, 1976).

Se ha considerado de interés efectuar algunos ensayos, con la metódica propuesta en esta memoria, conducentes a conocer la posible influencia de los grupos sanguíneos en el modelo general electroforético de la FA en sueros normales. Se ha limitado el estudio únicamente a los grupos sanguíneos, excluyéndose el carácter secretor de los individuos.

De la muestra constituida por 525 sueros normales, solo se conocen 409 su grupo sanguíneo. Dichos sueros proceden del Banco de Sangre. La proporción de cada grupo sanguíneo no corresponde a la frecuencia de una distribución normal de individuos; ha habido una determinada elección de ciertos grupos para alcanzar un tamaño de muestra conveniente.

Actividad fosfatásica de los sueros respecto a grupos sanguíneos

La fosfatasa alcalina de los sueros estudiados, en U.I., clasificados según su grupo sanguíneo, se muestra a continuación:

Actividad fosfatásica de sueros según grupo sanguíneo												
	O		A ₁		A ₂		B		A ₁ B		A ₂ B	
	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
f.	80	21	69	19	11	7	84	24	64	6	19	5
\bar{x}	32,9	31,6	31,1	27,3	27,2	34,1	29,6	30,6	24,7	22,2	25,4	27,6
D.S.	10,7	9,8	9,3	10,6	7,1	11,6	10,5	11,8	9,4	14,4	8,6	8,3

Cualitativamente, se observa que los valores medios de la actividad fosfatásica de cada grupo sanguíneo difieren algo entre ellos. Así, el valor medio de la FA de todos los grupos positivos y negativos es de 29,44 y 27,6 U.I. respectivamente; la diferencia es de 1,54 U.I. a favor del grupo positivo, que representa un 5,2%.

Aplicado el criterio estadístico del "t" de Student, y utilizando las expresiones siguientes por tratarse de series con grados de libertad distintos

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_x} \quad s_x = \frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2} \quad \frac{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

donde

n = tamaño de la muestra

s = desviación standard

Teniendo en cuenta el factor Rh, la muestra total se fracciona en 327 positivos y 82 negativos. En la tabla siguiente se indican sus medias y desviaciones standards en U.I. de fosfatasa alcalina

	Rh +	Rh -
f.	327	82
\bar{x}	29,44	27,90
D.S.	9,9	10,9

Aplicando las expresiones anteriores se obtiene una "t" de 1,23 que al nivel de 0,05 no es significativo.

En la tabla siguiente se indica las "t" obtenidas por combinación de todos los grupos sanguíneos.

Valores de t de la FA en sueros según grupos sanguíneos

Combin.	t	Combin.	t	Combin.	t	Combin.	t
0+/A ₁ +	1,08	0+/A ₂ +	1,71	0+/B+	1,99	0+/A ₁ B+	4,82
0+/A ₂ B+	2,84	A ₁ +/A ₂ +	1,32	A ₁ +/B+	0,92	A ₁ +/A ₁ B+	3,94
A ₁ +/A ₂ B+	2,40	A ₂ +/B+	0,73	A ₂ +/A ₁ B+	0,83	A ₂ +/A ₂ B+	0,58
B+/A ₁ B+	2,94	B+/A ₂ B+	1,62	A ₁ B+/A ₂ B+	0,29	0-/A ₁ -	1,31
0-/A ₂ -	0,57	0-/B-	0,27	0-/A ₁ B-	1,86	0-/A ₂ B-	0,83
A ₁ -/A ₂ -	1,41	A ₁ -/B-	0,95	A ₁ -/A ₁ B-	0,95	A ₁ -/A ₂ B-	0,05
A ₂ -/B-	0,68	A ₂ -/A ₁ B-	1,66	A ₂ -/A ₂ B-	1,07	B-/A ₁ B-	1,50
B-/A ₂ B-	0,54	A ₁ B-/A ₂ B-	0,74	0+/0-	0,50	A ₁ +/A ₁ -	1,52
A ₁ B+/A ₁ B+	0,59	A ₂ B+/A ₂ B-	0,51	A ₂ +/A ₂ -	1,57	B+/B-	0,40
0+/A ₁ B-	2,30	0+/A ₁ -	2,05	0+/A ₂ -	0,28	0+/B-	0,90
0+/A ₂ B-	1,08	A ₁ +/A ₂ B-	0,81	A ₁ +/A ₂ -	0,79	A ₁ +/B-	0,21
A ₂ +/A ₁ B-	0,97	A ₂ +/A ₂ B-	0,09	A ₂ +/B-	0,88	0-/A ₁ +	0,21
B+/A ₂ B-	0,41	A ₁ +/A ₁ B-	2,14	B+/A ₁ B-	1,62	0-/A ₂ +	1,31
A ₁ B+/A ₂ B-	0,66	0-/A ₁ B+	2,88	0-/A ₂ B+	2,11	0-/B+	0,79
A ₁ -/A ₂ +	0,02	A ₁ -/A ₁ B+	1,02	A ₁ -/B+	0,86	A ₂ -/B+	1,08
A ₁ -/A ₂ B+	0,60	A ₂ -/A ₁ B+	2,45	B-/A ₁ B+	2,44	B-/A ₂ B+	1,61
A ₂ -/A ₂ B+	2,08	A ₁ B-/A ₂ B+	0,67				

De todas las combinaciones entre los grupos sanguíneos, resultan con una t superior a 2, las siguientes combinaciones:

Combinación	t	Combinación	t
$A_1B+/0+$	4,82	$A_1B-/0+$	2,30
A_1B+/A_1+	3,94	A_1B-/A_1+	2,14
$A_1B+/B+$	2,94	$A_2B+/0+$	2,84
$A_1B+/0-$	2,88	$A_2B+/0-$	2,11
A_1B+/A_2-	2,45	A_2B+/A_1+	2,40
$A_1B+/B-$	2,44	A_2B+/A_2-	2,08
		$0+/A_1-$	2,05

Se observa que los grupos A_1B+ y A_1B- , así como el grupo A_2B+ , tienen una FA pequeña, lo cual da lugar a que las diferencias con el resto de los grupos origine diferencias significativas al nivel de probabilidad del 95%.

Número de bandas, en los geles, en relación a los grupos sanguíneos

Se ha indicado anteriormente que algunos autores han señalado que el número de bandas depende del grupo sanguíneo.

En la siguiente tabla de contingencia se muestra el número de bandas en los geles en relación al grupo sanguíneo, en nuestra casuística

G.Sang. Bandas	0+	0-	A_1+	A_1-	A_2+	A_2-	B+	B-	A_1B+	A_1B-	A_2B+	A_2B-	SUMA
2	12	2	36	3	3	2	19	5	40	5	6	-	133
3	17	3	13	8	4	4	24	8	14	1	7	3	106
4	18	5	16	6	3	1	12	3	7	-	2	1	74
5	18	5	2	2	1	-	19	6	3	-	4	1	61
6	11	3	2	-	-	-	6	2	-	-	-	-	24
7	2	3	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	9
8	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Suma	80	21	69	19	11	7	84	24	64	6	19	5	409

Puede observarse que algunos grupos sanguíneos presentan un número mayor de bandas que otros. Esta observación cualitativa se ha creído conveniente confirmarla por aplicación de algún criterio estadístico en el que se ponga de manifiesto la dependencia o independencia entre los grupos sanguíneos y el número de bandas en el gel. Debe tenerse en cuenta, además, que en el apartado 5.1. en la muestra general de 525 sueros, se puso de manifiesto que la frecuencia de las bandas obedecía a una ecuación de 2° grado decreciente, de lo cual puede inferirse que en muestras pequeñas, como en ciertos grupos sanguíneos, exista poca probabilidad de presentar geles con muchas bandas.

Prueba de χ^2 para deducir la dependencia del número de bandas y grupos sanguíneos

La prueba de χ^2 tiene aplicación cuando se desea conocer la bondad del ajuste de un modelo teórico a unos resultados experimentales en frecuencias. Responde a la cuestión de si en una muestra hay dependencia entre dos factores, en este caso si las distribuciones de frecuencias del número de bandas en los geles dependen de los grupos sanguíneos del suero. Cuando los factores son independientes la distribución general de frecuencias se aparta de la normalidad, a un nivel de probabilidad determinado.

Para esta prueba se ha seguido el proceder indicado por Viedma (1976), si bien no se han unido grupos para que las frecuencias teóricas fueran superiores a 5 y lograr así una mayor aproximación.

Las frecuencias del número de bandas en los geles de los grupos sanguíneos, o de contingencia, figuran en la tabla del párrafo anterior.

Para calcular las frecuencias esperadas o teóricas se multiplica las probabilidades de los distintos niveles cruzados por la suma general de bandas. Así, la frecuencia esperada para la celda correspondiente al grupo sanguíneo 0+ y 2 bandas, se obtiene de la siguiente forma:

$$\frac{80}{409} \times \frac{133}{409} \times 409 = 26,02$$

Frecuencias esperadas o teóricas

G.Sang. Bandas	0+	0-	A ₁ +	A ₁ -	A ₂ +	A ₂ -
2	26,02	6,83	22,44	6,18	3,38	2,28
3	20,73	5,44	17,88	4,92	2,85	1,81
4	14,47	3,80	12,48	3,44	1,99	1,27
5	11,93	3,13	10,29	2,83	1,64	1,04
6	4,69	1,23	4,05	1,11	0,65	0,41
7	1,76	0,46	1,52	0,42	0,24	0,15
8	0,38	0,10	0,38	0,09	0,05	0,03
Suma	80	21	69	19	11	7

G.Sang. Bandas	B+	B-	A ₁ B+	A ₁ B-	A ₂ B+	A ₂ B-	Suma
2	27,32	7,80	20,21	1,95	6,18	1,63	133
3	21,77	6,22	16,59	1,56	4,92	1,30	106
4	15,20	4,34	11,58	1,09	3,44	0,91	74
5	12,53	3,58	9,95	0,90	2,83	0,75	61
6	4,93	1,41	3,76	0,35	1,11	0,25	24
7	1,85	0,53	1,41	0,13	0,42	0,11	9
8	0,41	0,12	0,31	0,03	0,09	0,02	2
Suma	84	24	64	6	19	5	409

Para calcular el valor de χ^2 se hace uso de la expresión

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^f \sum_{j=1}^c \frac{(Ob_{ij} - t_{ij})^2}{t_{ij}}$$

donde

f = filas
c = columnas
Ob = frec. observada
t = frec. teóricas

Cálculo de χ^2

f. obs.	f. teor.	(Ob - t) ²	$\frac{(Ob-t)^2}{t}$	f. obs.	f. teor.	(Ob - t) ²	$\frac{(Ob-t)^2}{t}$
12	26,02	196,5	7,554	19	12,52	41,86	3,340
2	6,83	23,33	3,417	6	3,85	5,85	1,635
36	22,44	183,87	8,194	3	9,95	48,30	4,854
3	6,18	10,11	1,636	0	0,90	0,81	0,900
3	3,58	0,33	0,094	4	2,83	1,39	0,484
2	2,28	0,078	0,034	1	0,75	0,06	0,083
19	27,32	69,22	2,533	11	4,69	39,82	8,489
5	7,80	7,84	0,010	3	1,23	3,83	2,547
40	20,21	391,60	19,378	2	4,05	4,20	1,037
5	1,95	9,30	4,770	0	1,11	1,23	1,110
6	6,18	0,03	0,005	0	0,65	0,42	0,650
0	1,63	2,65	1,630	0	0,41	0,17	0,410
17	20,73	13,91	0,671	6	4,93	1,14	0,232
3	5,44	5,95	1,094	2	1,41	0,35	0,247
13	17,88	23,81	1,332	0	3,76	14,14	3,760
8	4,92	9,48	1,928	0	0,35	0,12	0,350
4	2,85	1,32	0,464	0	1,11	1,23	1,110
4	1,81	4,79	2,650	0	0,25	0,06	0,250
24	21,77	4,97	0,228	2	1,76	0,05	0,032
8	6,22	3,17	0,509	3	0,46	6,45	14,025
14	16,59	6,71	0,404	0	1,32	2,31	1,520
1	1,56	0,31	0,201	0	0,42	0,18	0,420
7	4,92	4,33	0,879	0	0,24	0,06	0,240
3	1,30	2,89	2,223	0	0,15	0,02	0,150
18	14,47	12,46	0,861	4	1,85	4,62	2,499
5	3,80	1,44	0,379	0	0,53	0,28	0,530
16	12,48	12,38	0,993	0	1,41	1,99	1,410
6	3,44	6,55	1,905	0	0,13	0,02	0,130
3	1,99	1,02	0,513	0	0,42	0,18	0,420
1	1,27	0,07	0,057	0	0,11	0,01	0,111
12	15,20	10,24	0,674	2	0,39	2,59	6,646
3	4,34	1,79	0,414	0	0,10	0,01	0,100
7	11,58	20,97	1,811	0	0,38	0,14	0,380
0	1,09	3,61	1,090	0	0,09	0,01	0,090
2	3,44	2,07	0,603	0	0,05	0,01	0,050
1	0,91	0,01	0,008	0	0,03	0,01	0,030
18	11,93	36,84	3,088	0	0,41	0,16	0,410
5	3,13	3,49	1,117	0	0,12	0,01	0,120
2	10,29	68,72	6,679	0	0,31	0,09	0,310
2	2,83	0,69	0,243	0	0,03	0,01	0,030
1	1,64	0,41	0,250	0	0,09	0,01	0,090
0	1,04	1,08	1,040	0	0,02	0,01	0,020
				$\chi^2 = 144,814$			

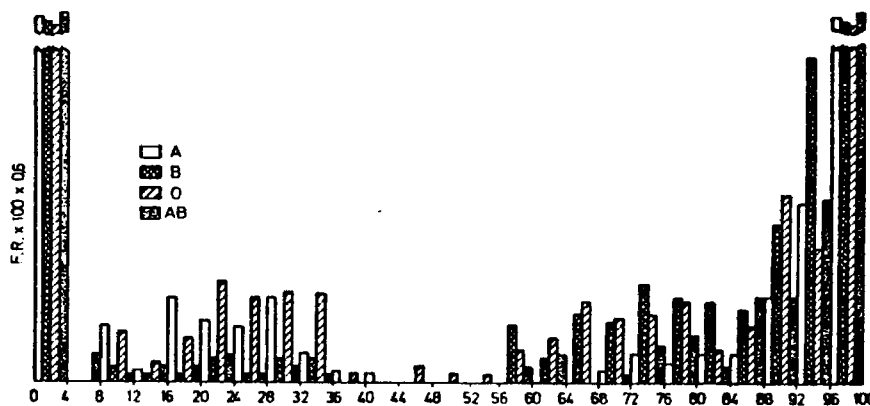
Consultadas las tablas de distribución χ^2 de Pearson para $\alpha = 0,05$ y 66 grados de libertad se obtiene el valor de 47,46.

Como el valor de χ^2 de la prueba es de 144,814 muy superior a 47,46, debe aceptarse la dependencia entre el número de bandas en el gel y los grupos sanguíneos al nivel de significación del 5%.

Posición y AF de las bandas en los geles según los grupos sanguíneos

Se han unido grupos y subgrupos sanguíneos, con propósito de simplificación, quedando reducidos a las siguientes agrupaciones: A, B, O y AB.

La posición preferencial de las bandas y gráfico correspondiente así como el valor medio de AF en las posiciones, figuran a continuación:



Posición de las bandas en geles según el grupo sanguíneo

Extr. intv.: Extremos de los intervalos del recorrido de la banda anódica
 f. : Frecuencia de las bandas
 fr% : Frecuencia relativa x 100

Extr.	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96
intv.	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96	100

Grupo sanguíneo A

f. 106 - 7 2 11 8 7 11 4 2 1 - - - - - 2 4 3 4 4 11 23 106
 fr% 33,6 - 2,3 0,6 3,5 2,6 2,3 3,5 1,2 0,6 0,3 - - - - - 0,6 1,2 0,9 1,2 1,2 3,5 7,3 33,6

Grupo sanguíneo B

f. 108 - 3 2 2 4 2 4 1 - - - - - 9 4 11 10 16 14 13 12 26 54 108
 fr% 26,8 - 0,7 0,4 0,4 1,0 0,4 1,0 0,2 - - - - - 2,3 1,0 2,8 2,5 4,0 3,5 3,3 3,0 6,5 3,4 26,8

Grupo sanguíneo O

f. 101 - 9 7 8 18 15 16 6 2 - 3 2 2 6 8 14 11 12 14 6 10 33 24 101
 fr% 23,7 - 2,1 1,6 1,8 4,2 3,5 3,7 1,4 0,4 - 0,7 0,4 0,4 1,4 1,8 3,3 2,6 2,8 3,3 1,4 2,3 7,7 5,6 23,7

Grupo sanguíneo AB

f. 94 3 1 2 2 3 1 2 1 - - - - - 2 3 - 1 4 5 2 9 9 19 94
 fr% 36,7 1,2 0,3 0,7 0,7 1,2 0,3 0,7 0,3 - - - - - 0,7 1,2 - 0,3 1,6 2,0 0,7 3,6 3,6 7,5 36,7

Valor medio de la AF en geles según grupo sanguíneo

Extr. intv.: Extremos de los intervalos del recorrido de la banda anódica

$\bar{x}(AF)$: Valor medio de la actividad fosfatásica de las bandas

D.S. : Desviación standard de la media de la AF

Extr.	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96
intv.	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96	100

Grupo sanguíneo A

$\bar{x}(AF)$	7	-	1	1	2	2	3	3	3	2	-	-	-	-	-	-	-	5	3	3	4	9	34	39	78
D.S.	3	-	1	0	1	1	1	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	4	2	1	2	4	10	8	20

Grupo sanguíneo B

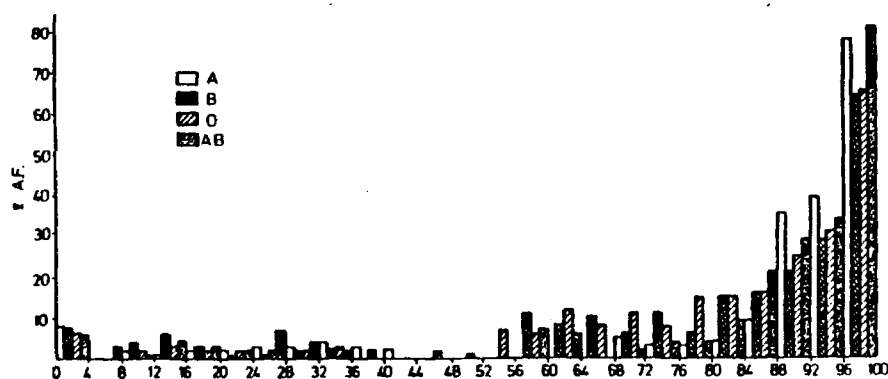
$\bar{x}(AF)$	8	-	4	6	3	1	1	2	2	-	-	-	-	-	10	8	10	6	11	6	15	16	21	29	64
D.S.	4	-	0	4	2	0	0	1	1	-	-	-	-	-	3	4	6	4	7	3	10	6	10	10	23

Grupo sanguíneo O

$\bar{x}(AF)$	7	-	2	3	2	2	2	2	3	2	-	2	1	7	5	12	8	11	8	15	15	16	25	31	65
D.S.	3	-	1	2	1	1	1	1	1	1	-	1	0	0	4	5	7	5	5	9	8	9	9	9	23

Grupo sanguíneo AB

$\bar{x}(AF)$	6	3	1	4	3	2	7	4	2	-	-	-	-	-	7	6	-	2	3	4	9	21	29	34	81
D.S.	4	3	-	4	2	2	-	4	-	-	-	-	-	-	3	4	-	-	2	1	9	9	12	9	21



La agrupación A presenta cierta preferencia por situar las bandas en el primer tercio del gel, mientras que la agrupación B lo hace en el último tercio, destacándose una banda en el intervalo 90-96% y algunas bandas en la zona del 50-80% del recorrido de la banda anódica. El grupo O, por contener numerosas bandas, estas se distribuyen por todo el gel, haciéndose más ostensibles en el primer tercio.

La distribución de la actividad fosfatásica en el gel es muy parecida en todas las agrupaciones con una imagen análoga al modelo general, si bien puede señalarse que en la zona de mayor movilidad se observa una mayor actividad correspondiente al grupo A.

5.2. HOMOGENADOS DE ORGANOS SANOS

Se hace un estudio con homogenados de órganos sanos con el propósito de conocer, en el gel de poliacrilamida, las distintas fracciones con actividad fosfatásica. De la posición de éstas en el gel y de su actividad fosfatásica, se intenta obtener alguna información utilizable para determinar correlaciones entre bandas y órganos que producen fosfatasa alcalina y que posteriormente se pueden encontrar en el suero.

5.2.1. Actividad fosfatásica de los homogenados

Hígado

La muestra comprende 8 necropsias y 2 biopsias, obtenidas y preparadas como se indica en la metodología.

La actividad fosfatásica de estos homogenados, cuya individualización se encuentra en las tablas del apéndice, se muestra a continuación:

Las muestras han sido obtenidas y preparadas como se indica en la metodología

Estadísticos de los homogenados de órganos

<u>Organo</u>	<u>Muestra</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x}(U.I./g)</u>	<u>DS(U.I./g)</u>
Hígado	Necropsias	8	319	206
"	Biopsias	2	34,5	26
Intestino	Necropsias	4	327	11,4
"	Biopsias	5	356	106
Riñón	Necropsias	8	75,4	44,9
Hueso	Necropsias	7	114,6	27,6
Placenta	Biopsias	6	360	217

En el hígado, las muestras procedentes de las necropsias contienen una mayor actividad fosfatásica por gramo de tejido que las biopsias, mientras que en el intestino la F.A. de las biopsias es diez veces mayor que las necropsias, posiblemente en este último tejido la autólisis puede que sea más intenso.

En general es de destacar la alta dispersión de la F.A. en los homogenados.

5.2.2. Número, recorrido, posición preferencial de las bandas en el gel

La metodología seguida en la electroforesis del gel con los homogenados es análoga a la utilizada con los sueros.

El número de bandas que aparecen en los geles de los homogenados estudiados se muestran a continuación:

	<u>Hígado</u>	<u>Intestino</u>	<u>Riñón</u>	<u>Hueso</u>	<u>Placenta</u>
2 Bandas	0	0	0	1	0
3 Bandas	4	3	2	4	0
4 Bandas	3	4	3	0	1
5 Bandas	2	2	3	0	4
6 Bandas	1	0	0	2	1

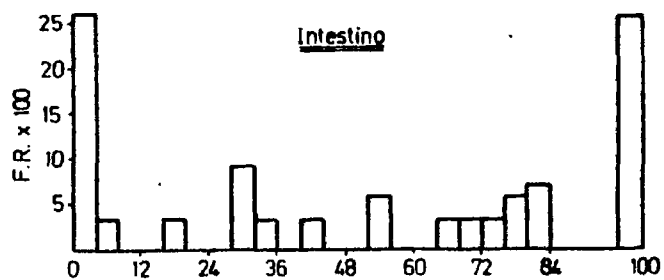
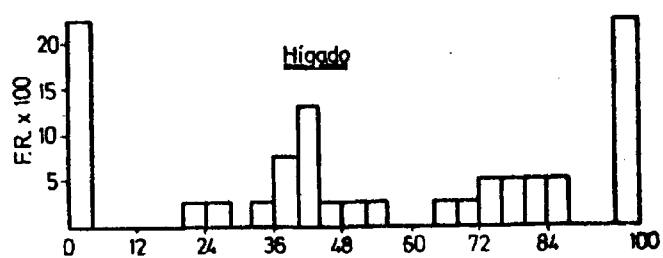
Contrariamente a los sueros, no aparecen geles con solamente 2 bandas, se exceptúa una necropsia de hueso. No se encuentran geles con 7 y 8 bandas.

El recorrido medio de la banda anódica de cada grupo de homogenados es de 6,82; 6,69; 6,67; 6,59 y 5,43 cm para la pla-

centa, hígado, riñón, hueso e intestino, respectivamente.

La posición de las bandas en el gel de los homogenados se muestra en la siguiente tabla.

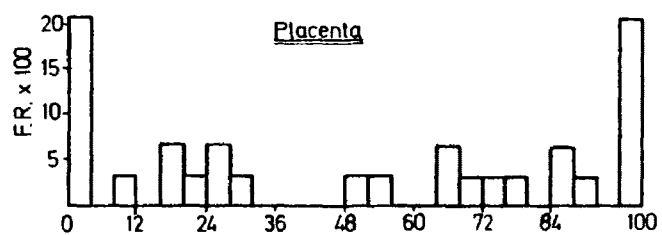
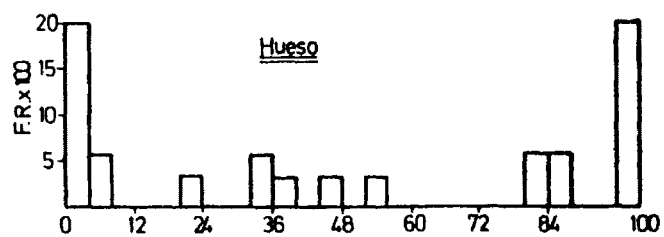
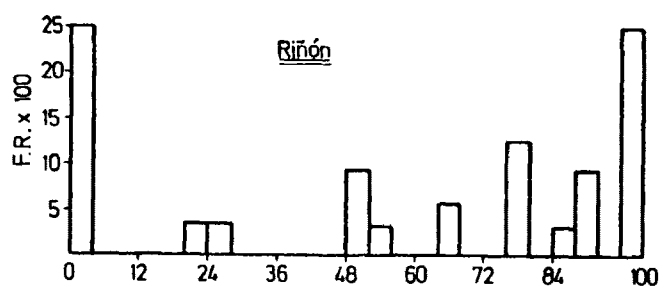
Las gráficas correspondientes se exponen a continuación:



Posición de las bandas en geles de los homogenados

Ext. intr.: Extremos de los intervalos del recorrido de la banda anódica
 f.: frecuencia de las bandas
 Fra.: frecuencia relativa x 100

Ext. intr.	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96
intr.	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96	100
<u>Hgado</u>																									
f.	10	-	-	-	-	1	1	-	1	3	6	1	1	1	-	-	1	1	2	2	2	2	-	-	10
Fra.	22,3	-	-	-	-	2,2	2,2	-	2,2	6,8	1,3	2,2	2,2	2,2	-	-	2,2	2,2	4,4	4,4	4,4	4,4	-	-	22,3
<u>Intestino</u>																									
f.	9	1	-	-	1	-	-	3	1	-	1	-	-	2	-	-	1	1	1	2	3	-	-	-	9
Fra.	25,7	2,3	-	-	2,9	-	-	8,6	2,9	-	2,9	-	-	5,7	-	-	2,9	2,9	2,9	5,7	8,6	-	-	-	25,7
<u>Huñón</u>																									
f.	8	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	3	1	-	-	2	-	-	4	-	1	3	-	-	8
Fra.	25,0	-	-	-	-	3,1	3,1	-	-	-	-	9,4	3,1	-	-	6,3	-	-	1,2	-	3,1	9,4	-	-	25,0
<u>Hueso</u>																									
f.	7	2	-	-	-	1	-	-	2	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	2	2	-	-	-	7
Fra.	20,0	5,7	-	-	-	2,9	-	-	5,7	2,9	-	2,9	-	2,9	-	-	-	-	-	5,7	5,7	-	-	-	20,0
<u>Placenta</u>																									
f.	6	-	1	-	2	1	2	1	-	-	-	-	1	1	-	-	2	1	1	1	-	2	1	-	6
Fra.	20,6	-	3,4	-	6,9	3,4	6,9	3,4	-	-	-	-	3,4	3,4	-	-	6,9	3,4	3,4	3,4	-	6,9	3,4	-	20,6

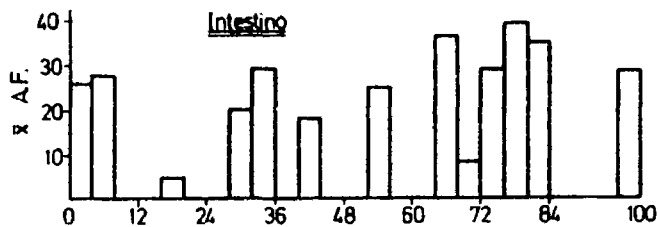
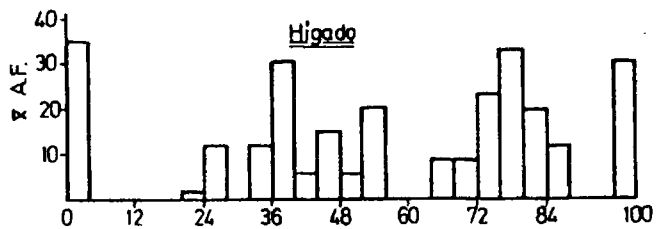


5.2.3. Actividad fosfatásica de las bandas del gel de homogenados

En los homogenados se ha seguido la misma metodología que en los sueros.

En la tabla siguiente se muestra la actividad fosfatásica media de las bandas en los geles.

Sus correspondientes gráficas son:



Actividad fosfatásica media de las bandas de los geles

Extr. intrv.: Extremos de los intervalos del recorrido de la banda anódica

$\bar{x}(AF)$: Valor medio de la actividad fosfatásica de las bandas

Extr.	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96
intrv.	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96	100

Hígado

$\bar{x}(AF)$ 35,3 - - - - 2 12 - 12 30 6 15 6 20 - - 9 9 22 33 19 12 - - 30

Intestino

$\bar{x}(AF)$ 26 28 - - 5 - - 20 29 - 18 - - 25 - - 36 7 28 37 35 - - - 27

Riñón

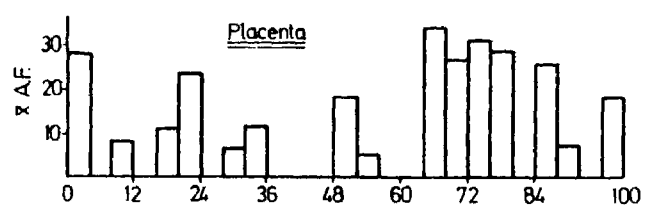
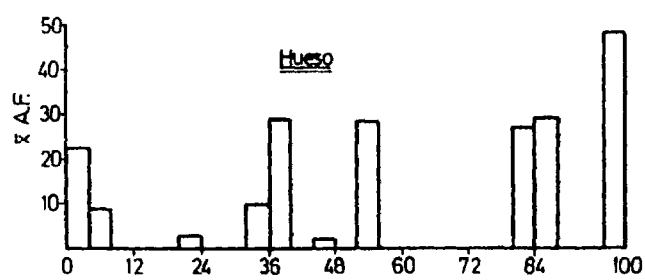
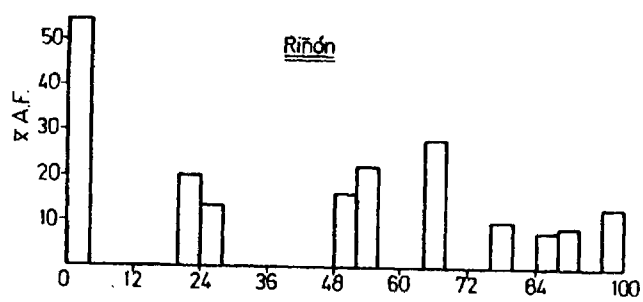
$\bar{x}(AF)$ 54 - - - - 20 14 - - - - 16 23 - - 28 - - 10 - 8 9 - 14

Hueso

$\bar{x}(AF)$ 23 9 - - - 3 - - 10 28 - 3 - 28 - - - - - 26 28 - - 48

Placenta

$\bar{x}(AF)$ 27 - 8 - 11 24 - 6 12 - - - 18 5 - - 34 27 31 29 - 26 7 - 18



Las máximas actividades enzimáticas en los homogenados aparecen en las bandas situadas en los siguientes lugares.

Hígado -----	Banda catódica
Intestino -----	Banda situada entre el 64 al 84%
Riñón -----	Banda catódica
Hueso -----	Banda anódica
Placenta -----	Banda situada entre el 64 al 78%.

5.2.4. Estudio sobre mezclas de homogenados de órganos y sueros normales

Cabe la posibilidad de que las fracciones enzimáticas de la fosfatasa alcalina resultantes en el homogenado de los órganos difieran de las fracciones encontradas en suero y por tanto con propiedades algo distintas. El comportamiento de la mezcla de homogenados de órganos y sueros pudiera servir para poner de manifiesto analogías y diferencias entre ellas. Asimismo, esas mezclas, también, pudieran servir o proporcionar alguna información que pudiera ser de utilidad en la identificación de las fracciones electroforéticas en los geles como isoenzimas de la fosfatasa alcalina.

La metodología seguida para estos ensayos consistió en dejar que espontáneamente los tejidos de los órganos, conservados en nevera a -20°C , adquirieran la temperatura ambiente, seguidamente se determina su actividad fosfatásica así como su montaje para la separación electroforética en el gel de acrilamida. Simultáneamente, se determina la FA del suero y de la mezcla y separación electroforética en el gel. De esta manera, efectuado todo el ensayo en una misma tanda, los errores son iguales para todos y los resultados pueden ser comparados. La mezcla se hace a iguales volúmenes, 0,5 ml de homogenado y 0,5 ml de suero.

En el apéndice, como anexo n° 7, se relacionan los ensayos con indicación del órgano, actividad fosfatásica total, posición de las bandas en el gel y actividad fosfatásica porcentual de las mismas.

En la siguiente tabla se exponen los resultados hallados de los 19 ensayos efectuados de la fosfatasa alcalina en U.I. El

valor esperado es la media aritmética de la FA del homogenado y del suero.

ORGANO	N°	F.A. (U.I.)		MEZCLA (U.I.)	
		Homogenado	Suero	Valor esperado	Valor hallado
Hígado	1	565	15	290	178
	2	567	47	307	297
	3	394	47	220	140
	4	126	53	89	82
Intest.	1	37	15	26	30
	2	37	47	42	44
	3	24	47	35	37
Biop.	4	394	53	223	209
Riñón	1	45	15	30	33
	2	140	47	93	43
	3	45	47	46	64
	4	140	53	96	53
Hueso	1	114	15	64	52
	2	77	47	62	59
	3	114	47	80	99
	4	113	53	83	33
				$\Sigma=1786$	$\Sigma=1453$
Placenta	1	200	15	107	107
	2	135	47	91	109
	3	200	47	123	155

La suma de todos los valores de la FA esperados o teóricos de las mezclas, exceptuándose la placenta, asciende a 1786 U.I., mientras que la suma de las FA halladas es de 1453 U.I. La diferencia global es de 333 U.I. Se produce una pérdida de actividad fosfatásica del 19% por el mero hecho de mezclar los homogenados con los sueros normales.

Las diferencias entre los valores de F.A. esperados y hallados, en forma individual, de las mezclas no pueden ser atribuidos a la variabilidad de la metódica ya que se ha comprobado que

el coeficiente de variabilidad en la determinación de FA es inferior al 2%, según 4.2.1. Por tanto, esta pérdida de la actividad de la FA en las mezclas debe provenir de la presencia de sustancias con propiedades inhibitorias, bien en los homogenados o en el suero; o también, de alteraciones de las fracciones.

La pérdida de actividad fosfatásica en esas mezclas es variable; resulta máxima en el riñón con un 27%, seguida del hígado con un 23%, y del hueso con 16%. En el intestino prácticamente no hay pérdida. Por el contrario, en el homogenado de placenta hay un aumento del 15%.

En el anexo correspondiente figura junto a otros datos la posición de las bandas en los geles de los componentes y de la mezcla, de cada ensayo. En el mapa posicional se observa que en las mezclas aparecen bandas que no se encuentran en los componentes (ensayos 1 y 19); en otros casos, bandas presentes en los componentes no aparecen en la mezcla (ensayos 8, 17 y 18). Muy corriente es el desplazamiento de bandas en la mezcla en ambos sentidos. Esto último pudiera explicarse por la dispersión de las fracciones isoenzimáticas en el gel debido a que los ensayos no pudieron ser efectuados en la misma serie y día por razones técnicas. Considerando esta posible dispersión se han tomado unos intervalos amplios que coinciden con la posición habitual de algunas isoenzimas de la fosfatasa alcalina.

La actividad fosfatásica de las bandas resultantes en los geles de la mezcla de homogenados de órganos y sueros normales, junto con las actividades de sus componentes figura en la tabla de las hojas siguientes, en donde los valores de la actividad fosfatásica de las bandas, AF, se expresan en valores absolutos convencionales obtenidos mediante producto del porcentaje de la actividad de la banda por la FA del homogenado, suero o mezcla. No se

pueden considerar como actividades absolutas debido a que los sus tratos son diferentes. Los valores obtenidos de AF se calcularon según se indica en el Anexo nº8 del Apéndice.

Sumadas las actividades fosfatásicas de las bandas en un determinado intervalo amplio, en unidades absolutas convencionales, de los valores esperados así como de los hallados, con excepción del ensayo con el homogenado de la placenta, se obtiene:

Posiciones de las bandas	£ esperado	£ hallado	Diferencia	Porcentaje
GENERAL				
Banda catódica	481,9	369,2	- 85,7	18
" 10-40% r.	261,6	111,1	-150,5	58
" 50-80 "	417,7	294,7	-123	29
" 80-90 "	30,1	78,3	+ 48,2	160
" anódica	611,3	570,4	- 40,9	7
	1802,6	1450,7	-351,9	20
RINON				
Banda catódica	91,1	58,4	- 32,7	36
" 10-40% r.	38,8	8,7	- 30,1	78
" 50-80 "	50,3	23,4	- 26,9	53
" 80-90 "	5,6	22,3	+ 16,7	298
" anódica	88,3	84	- 4,3	5
	274,1	196,8	- 77,3	28
HUESO				
Banda catódica	52,1	62,4	+ 10,3	20
" 10-40% r.	14,5	6,5	- 8	55
" 50-80 "	63,9	18,6	- 45,3	71
" 80-90 "	24,5	56	+ 31,5	128
" anódica	126,8	98,5	- 30,3	24
	281,8	240	- 41,8	15
HIGADO				
Banda catódica	258,7	203,4	- 55,3	21
" 10-40% r.	159,9	65,2	- 94,7	59
" 50-80 "	279,7	151,4	-128,3	46
" anódica	214,4	278,2	+ 63,8	30
	912,7	698,2	-214,5	24
INTESTINO				
Banda catódica	79,7	72	- 7,7	10
" 10-40% r.	48,4	30,7	- 17,7	36
" 50-80 "	20,8	105,1	+ 84,3	405
" anódica	181,7	111,7	- 70	39
	330,6	319,5	- 11,1	3,3

Los porcentajes se han obtenido con respecto al valor esperado

Actividad enzimática de las bandas de los geles en las mezclas de homogenados y sueros normales.

N°	Posición de la Banda en el gel <u>intervalos del recorrido</u>	A.F. Organos sueros		A.F. de la mezcla	
		<u>Riñón</u>	<u>Suero N</u>	<u>Esperado</u>	<u>Hallado</u>
1	Catódica	29,3	0,30	14,8	15,8
	10 al 40% recorrido	0	0	0	2,3
	50 al 80% recorrido	14,4	0,6	7,2	2,9
	Anódica	22,5	14,1	18,2	11,9
2	Catódica	53,2	5,6	29,4	10,3
	10 al 40% recorrido	37,8	0	18,9	0
	50 al 80% recorrido	35,0	1,9	17,5	0
	Anódica	14,0	39,5	26,7	32,7
3	Catódica	28,4	5,6	16,9	21,7
	50 al 80% recorrido	14,4	1,9	8,1	4,5
	Anódica	2,3	39,5	20,8	37,7
4	Catódica	53,2	8,5	30,8	10,6
	10 al 40% recorrido	37,8	2,1	19,9	6,4
	50 al 80% recorrido	35,0	0	17,5	11,7
	80 al 90% recorrido	11,2	0	5,6	22,3
	Anódica	2,8	42,4	22,6	1,7
5	Catódica	29,6	0,3	14,9	12,5
	10 al 40% recorrido	1,1	0	0,6	0,7
	50 al 80% recorrido	62,7	0	31,4	16,6
	80 al 90% recorrido	3,4	0,6	2,0	3,1
	Anódica	6,8	14,1	10,5	16,1
6	Catódica	25,4	5,6	15,5	12,9
	10 al 40% recorrido	2,3	0	1,2	1,2
	50 al 80% recorrido	2,3	0	1,2	0
	80 al 90% recorrido	37,7	1,9	19,8	7,7
	Anódica	8,5	39,5	23,9	37,2

N°	Posición de la Banda en el gel <u>intervalos del recorrido</u>	A.F. Organos sueros		A.F. de la mezcla	
		Hueso	Suero N	Esperado	Hallado
7	Catódica	29,6	5,2	17,4	32,7
	10 al 40% recorrido	1,5	0,5	1,0	0
	50 al 80% recorrido	62,7	0	31,3	2,0
	80 al 90% recorrido	3,4	1,9	2,7	24,7
	Anódica	6,8	39,5	23,2	39,6
8	Catódica	5,6	8,5	4,3	4,3
	10 al 40% recorrido	11,3	2,1	6,7	4,6
	80 al 90% recorrido	0	0	0	20,5
	Anódica	96,1	42,4	69,2	3,6
9	Catódica	158,2	0,3	79,3	53,4
	10 al 40% recorrido	141,3	0	70,6	14,2
	50 al 80% recorrido	180,8	0,6	90,7	69,4
	Anódica	90,4	14,1	52,3	40,9
10	Catódica	158,7	5,6	82,2	92,1
	10 al 40% recorrido	141,7	0	70,9	38,6
	50 al 80% recorrido	181,4	1,9	91,7	62,4
	Anódica	90,7	39,5	65,1	103,9
11	Catódica	94,6	5,6	50,1	35,0
	10 al 40% recorrido	19,7	0	9,8	4,2
	50 al 80% recorrido	181,2	1,9	91,6	19,6
	Anódica	98,5	39,5	68,9	82,6
12	Catódica	85,7	8,5	47,1	22,9
	10 al 40% recorrido	15,1	2,1	8,6	8,2
	50 al 80% recorrido	11,34	0	5,7	0
	Anódica	13,8	42,4	28,1	50,8
13	Catódica	7,4	0,3	3,8	6,6
	10 al 40% recorrido	10,7	0	5,4	3,0
	50 al 80% recorrido	13,3	0,6	6,9	6,0
	Anódica	5,6	14,1	9,8	14,4

N°	Posición de la Banda en el gel intervalos del recorrido	A.F. Organos sueros		A.F. de la mezcla	
		Intest.	Suero N	Esperado	Hallado
14	Catódica	7,4	5,6	6,3	8,4
	10 al 40% recorrido	10,7	0	5,4	4,8
	50 al 80% recorrido	13,3	5,5	9,2	4,4
	Anódica	5,5	39,5	22,5	26,4
15	Catódica	6,9	5,6	6,3	8,9
	10 al 40% recorrido	1,9	0	0,9	0
	50 al 80% recorrido	7,4	1,9	4,7	1,1
	Anódica	8,2	39,5	23,8	27,0
16	Catódica	118,2	8,5	63,3	48,1
	10 al 40% recorrido	70,9	2,5	36,7	22,9
	50 al 80% recorrido	0	0	0	94,1
	Anódica	208,8	42,4	125,6	43,9
17	Catódica	56,0	0,3	28,2	52,4
	10 al 40% recorrido	48,0	0	24,0	6,4
	50 al 80% recorrido	14,0	0	7,0	7,5
	80 al 90% recorrido	54,0	0,6	27,3	8,6
18	Catódica	40,5	5,6	23,1	39,2
	10 al 40% recorrido	9,4	0	4,7	7,6
	50 al 80% recorrido	41,8	1,9	21,1	9,8
	Anódica	43,2	39,5	41,3	41,4
19	Catódica	56,0	5,6	30,8	21,7
	10 al 40% recorrido	48,0	0	24,0	3,0
	50 al 80% recorrido	14,0	1,9	7,0	0
	80 al 90% recorrido	54,0	0	27,0	24,8
	Anódica	30,0	39,5	34,7	105,4

De los resultados, generalizando, se puede deducir:

- No se cumple corrientemente el criterio de aditividad de las actividades fosfatásicas en las bandas correspondientes.
- Aparecen bandas, en la mezcla, en posiciones que no se encuentran en los componentes. En otros casos, contrariamente, bandas existentes en los componentes no aparecen en el gel de la mezcla.
- Las anteriores anomalías no pueden justificarse por la variabilidad de la metódica:
 - a) Cada experimento fué realizado en la misma tanda, en las mismas condiciones experimentales.
 - b) La precisión en la medida densitométrica, aún en bandas de pequeña área, en geles distintos de la misma muestra, es de pequeña magnitud y no puede explicar la mencionada falta de aditividad de AF, así como de ausencias, apariciones y desplazamientos en las bandas en el gel.
- La pérdida de actividad fosfatásica en los geles afecta de diversa forma a los homogenados. Es máxima en el riñón (28%) seguida del hígado (24%). En el homogenado de hueso la pérdida de actividad es un poco inferior a la global (15%). El intestino apenas sufre pérdida de actividad al mezclarse con suero.
- Si en el espectro electroforético, cada banda en el gel se considera como perteneciente a una entidad enzimática determinada, la pérdida de actividad fosfatásica no es igual para todas las bandas:
 - En forma global, es mínima en la banda anódica, sufre pequeña pérdida la catódica. Las máximas pérdidas se encuentran en las bandas intermedias, sobre todo en la próxima a la catódica. En estos ensayos, de mezclas de homogenados de tejidos y suero, se produce un aumento de actividad en la banda cercana a la anódica.

- En forma individual, cada homogenado se comporta de manera distinta. El intestino presenta bastante estabilidad, únicamente es destacable el desplazamiento de la actividad de la banda anódica a favor de la situada en la zona del 50-80% del recorrido. En el hígado, la pérdida es alta, con desplazamiento de actividad en la mezcla a la banda anódica. En el hueso, se produce un aumento de actividad en la región del gel próximo a la banda anódica.
- En algunos casos, se observa que en la mezcla aparecen bandas bien marcadas aún cuando no se encuentren en los componentes. Esto se produce en la banda situada en la zona del 50-80%, en el intestino. En otras ocasiones, en esta misma zona, no aparecen bandas que figuran en los componentes.

5.2.5. Mezcla de homogenados de órganos

Se ha observado, en el apartado anterior, que cuando se mezclan homogenados de órganos y sueros normales, pocas veces se cumple en la mezcla el criterio de aditividad de los valores de la fosfatasa alcalina. En los geles, tampoco se cumple dicho criterio; la posición de las bandas, el número de ellas y la actividad fosfatásica de las mismas, no permanecen en los lugares ni tienen los valores esperados sino que, generalmente, se originan desplazamientos, ausencias y apariciones de bandas con cambios en la actividad en las mismas. Se sugirió que estas anomalías podrían ser causadas por sustancias contenidas tanto en el suero como en el homogenado o en ambos. Se intenta la resolución de este problema efectuando ensayos de mezclas con homogenados de órganos.

Se ha seguido la misma metodología utilizada en mezclas de homogenados de órganos y sueros. Las mezclas se han efectuado con

Volúmenes iguales. Forman un total de cuatro ensayos cuyos protocolos se encuentran en el apéndice.

Los resultados obtenidos en la determinación de la fosfatasa alcalina de los homogenados y sus mezclas, figuran a continuación:

N°	F.A. (U.I.)		Mezcla (U.I.)	
	<u>HOMOGENADOS</u>		<u>Valor esperado</u>	<u>Valor hallado</u>
1	<u>Hígado</u>	<u>Hueso</u>		
	126	113	119	140
2	<u>Hígado</u>	<u>Intestino</u>		
	126	456	291	572
3	<u>Hígado</u>	<u>Riñón</u>		
	126	140	133	167
4	<u>Hígado</u>	<u>Hueso</u>	<u>Riñón</u>	
	126	113	140	189
			Σ = 732	Σ = 1307

La mezcla de homogenados produce una exaltación en la actividad fosfatásica en todos los casos ensayados. El aumento de actividad es muy marcado, globalmente es del 80%.

En la tabla siguiente se muestran los resultados encontrados en los geles con mezclas de homogenados de órganos, en las que se expresan las actividades fosfatásicas de las bandas en cantidades absolutas convencionales, como en la mezcla de órganos y suero normal.

N° Posición de la banda en el gel <u>intervalos del recorrido</u>	A.F. ORGANOS			A.F. de la MEZCLA	
				Esperado	Hallado
1	<u>HIGADO+HUESO</u>				
Catódica	85,7	5,7		45,7	44,8
10 al 40% recorrido	15,1	11,3		13,2	8,4
50 al 80% recorrido	11,3	0		5,7	0
Anódica	13,9	96,1		55,0	86,8
2	<u>HIGADO+INTESTINO</u>				
Catódica	17,7	109,4		63,6	240,0
10 al 40% recorrido	15,1	91,2		45,7	11,4
50 al 80% recorrido	11,0	228,0		114,0	0
Anódica	13,9	27,4		20,6	320,3
3	<u>HIGADO+RIÑON</u>				
Catódica	85,7	53,2		69,4	138,6
10 al 40% recorrido	15,1	37,8		26,5	13,4
50 al 80% recorrido	11,3	35,0		23,2	5,0
80 al 90% recorrido	0	3,2		1,6	0
Anódica	13,9	2,8		8,3	10,0
4	<u>HIGADO+HUESO+RIÑON</u>				
Catódica	85,7	5,7	53,2	48,2	188,3
10 al 40% recorrido	15,1	11,3	37,8	21,4	38,5
50 al 80% recorrido	11,3	0	35,0	11,7	0
80 al 90% recorrido	0	0	11,2	3,7	29,9
Anódica	13,9	96,1	2,8	37,0	171,2

Aún cuando el número de ensayos es pequeño pueden extraer se las siguientes conclusiones:

- Analogamente a las mezclas de homogenados de órganos y sueros normales, en mezclas de únicamente homogenados de órganos tampoco se cumple en la mayoría de los casos el criterio de aditividad de las actividades fosfatásicas en las bandas.
- Algunas bandas de los componentes no se sitúan en el lugar esperado. En algunos casos, no aparecen bandas en el lugar

- del gel aún cuando en el gel de los componentes tengan existencia.

- Agrupados los valores de los ensayos

<u>Posición bandas</u>	<u>E esperado</u>	<u>E hallado</u>	<u>Aumento</u>	<u>Porcentaje</u>
Catódica	226,9	611,7	384,8	169
10-40% recorr.	106,8	71,7	-35,1	-33
50-80% "	131,4	5	-	-
Anódica	120,3	588,3	468	390

Puede decirse de los resultados anteriores que

- El aumento de la actividad fosfatásica de la mezcla se encuentra localizado en las fracciones correspondientes a las bandas catódica y anódica, con aumentos del 170 y 390% respectivamente, con relación a los valores esperados en las mezclas.
- Contrariamente, las bandas intermedias pierden actividad. La disminución de la banda próxima a la catódica llega a una tercera parte. La otra banda intermedia, en estos ensayos, prácticamente desaparece.

5.3. SUEROS PATOLOGICOS

Una vez estudiado el espectro electroforético de la fosfatasa alcalina en el gel de acrilamida de los sueros normales y de los homogenados de órganos como productores de las isoenzimas, el siguiente paso es el estudio, en la misma forma, de sueros patológicos. Se pretende obtener información, al menos, en dos aspectos: a) Analogías y diferencias entre los modelos electroforéticos, en el que se incluye posición y actividad fosfatásica de las bandas,

entre sueros de sujetos normales y patológicos en diversas enfermedades, y b) Contribuir a una posible ayuda en la identificación y correlación entre isoenzimas y bandas en el gel de acrilamida.

Los sueros patológicos proceden de enfermos hospitalizados y de la policlínica de la Ciudad Sanitaria "1° de Octubre". Sus diagnósticos pueden considerarse fiables ya que han sido revisados cuidadosamente para este fin por los Servicios correspondientes. Estos sueros han sido tratados en forma análoga a los sueros normales. Los resultados analíticos se consignan en el anexo n° 2 del Apéndice.

En la tabla siguiente figuran los diferentes sueros patológicos estudiados con expresión del número y del valor medio de la fosfatasa alcalina con su desviación standard.

Enfermedad	n	\bar{x}	D.S.	Enfermedad	n	\bar{x}	D.S.
HEPATOPATIAS	124	129	113	PANCREATITIS	23	57	36
Crónicas	46	71,4	43	E. OSEAS	25	298	317
Obstructivas	48	218,2	133	Paget (a)	14	450	348
Agudas	30	75,7	46	" (b)	3	51	19
E. RENALES	117	60,5	72,3	Art. rematoide	1	67	-
I.R.C.	97	53,5	43	Artrosis	1	32	-
Pielonefritis	4	43	17	Escoliosis	1	140	-
Glomeronefritis	6	78,8	75	Hiperparatiroid.	1	121	-
Fr.R.A.	2	46,6	262	Hipercalcemia	1	180	-
Trasplante	7	37,1	7	Raquitismo	1	145	-
Litiasis	1	35	-	Hipofosfatosis Fam.	5	67	34
E. PULMONARES	45	64	25	NINOS	16	102	41
B.O.C.	20	63	19				
Embolismo	3	48	8				
Asma	3	60	7				
Tuberculosis	10	52	14				
Bronquieta-sias	2	72	31				
Pneumotorax	2	59	2				
Neumonias	6	94	48				

5.3.1. Sueros de enfermedades hepáticas

Las enfermedades hepáticas se han agrupado en tres amplias fracciones considerando determinadas peculiaridades. Los grupos en global procesos de carácter obstructivo, agudos y crónicos. En estos grupos el número de muestras es suficientemente elevado para poner de manifiesto algunas características propias respecto a sus isoenzimas.

En las hepatopatías destaca marcadamente la alta actividad fosfatásica de los procesos obstructivos donde la media supera las 200 U.I., mientras que en los grupos de crónicos y agudos el valor medio de la F.A. es de alrededor de 70 U.I. En todos los grupos, la dispersión de los valores de la fosfatasa alcalina es bastante alta, debido probablemente a que los grupos incluyen diversos tipos de alteraciones hepáticas.

El número de bandas en el gel de acrilamida de los sueros de enfermos hepáticos, no sigue la distribución de frecuencias de los sueros normales, en estos la máxima frecuencia se encuentra en geles con dos bandas mientras que en los hepáticos lo más frecuente es que presenten cuatro o cinco bandas.

En el siguiente cuadro se muestra la frecuencia relativa x 100 del número de bandas de los geles de los grupos hepáticos y a continuación los diagramas de sueros normales y de hepatopatías.

<u>Frecuencia relativa x 100 del número de bandas del gel</u>							
<u>Bandas</u>	<u>Dos</u>	<u>Tres</u>	<u>Cuatro</u>	<u>Cinco</u>	<u>Seis</u>	<u>Siete</u>	<u>Ocho</u>
<u>Grupos</u>							
H. AGUDAS	25,8	29,0	25,8	19,3	-	-	-
H. OBSTRUCTIVAS	2	13	37	35	6		
H. CRONICAS	20	24,4	22,2	22,2	6,7	2,2	2,2

Posición de las bandas en los geles

Extr. inv.: Extremos de los intervalos del recorrido

f.: frecuencia de las bandas

f.r.%: frecuencia relativa x 100

Extr.	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96
inv.	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96	100

HEPATOPATIAS EN GENERAL

f.	124	-	15	5	8	12	11	4	4	1	2	1	2	4	2	2	6	10	9	19	21	21	47	35	124
f.r.%	25,4	-	3,0	1,0	1,6	2,4	2,2	0,8	0,8	0,2	0,4	0,2	0,4	0,8	0,4	0,4	1,2	2,0	1,8	3,6	4,4	4,4	9,7	7,3	25,4

AGUDAS

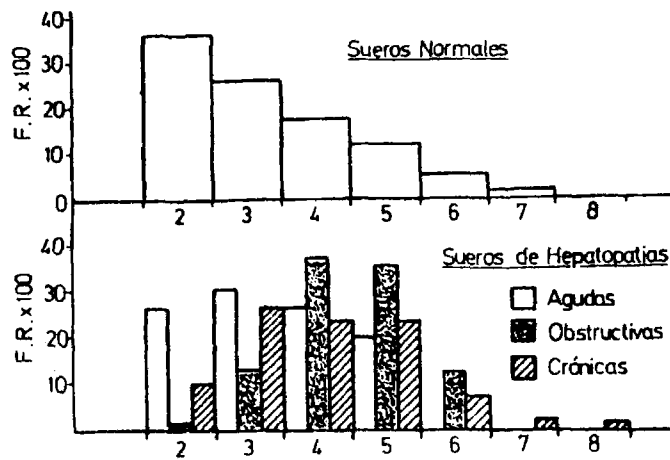
f.	30	-	1	1	-	3	1	2	-	-	-	-	2	-	-	-	1	-	1	4	3	4	14	7	30
f.r.%	28,7	-	1,0	1,0	-	2,9	1,0	1,9	-	-	-	-	1,9	-	-	-	1,0	-	1,0	3,9	2,9	3,9	13,4	6,7	28,7

OBSTRUCTIVAS

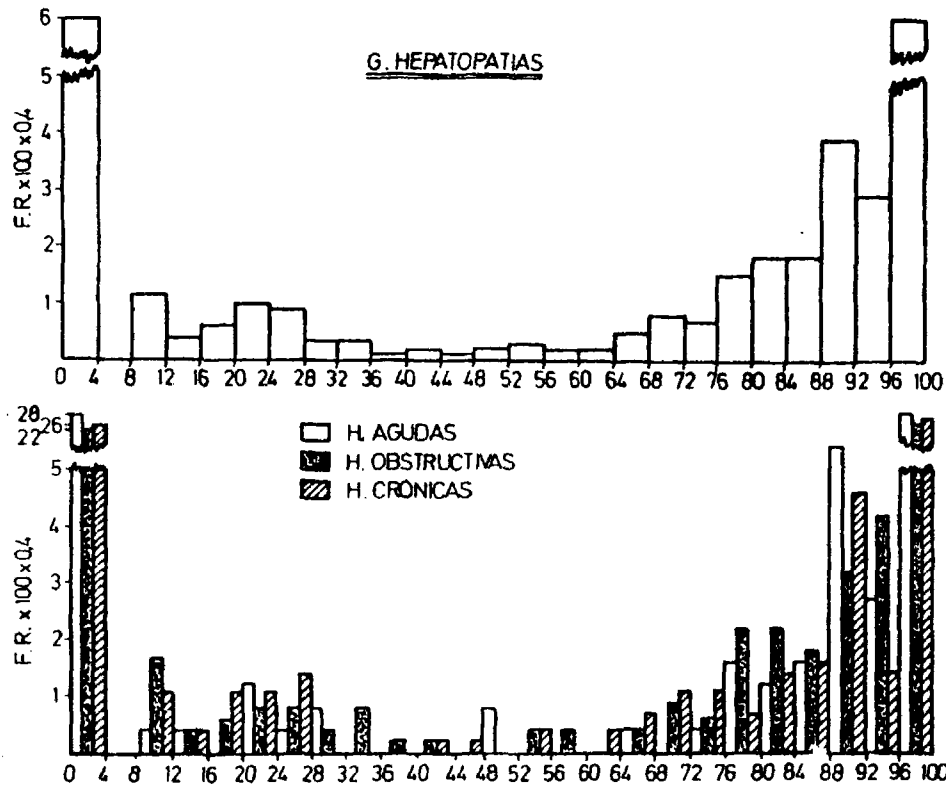
f.	4,8	-	9	2	3	4	4	2	4	1	1	-	-	2	2	-	2	5	3	12	12	10	17	22	48
f.r.%	22,6	-	4,2	0,9	1,4	1,9	1,9	0,9	1,9	0,5	0,5	-	-	0,9	0,9	-	0,9	2,3	1,4	5,6	5,6	4,6	8,1	10,4	22,6

CRONICAS

f.	4,6	-	5	2	5	5	6	-	-	-	1	1	-	2	-	2	3	5	5	3	6	7	20	6	46
f.r.%	26,2	-	2,4	1,1	2,8	2,8	3,4	-	-	-	0,6	0,6	-	1,1	-	1,1	1,7	2,8	2,8	1,7	3,4	4,1	11,4	3,4	26,2



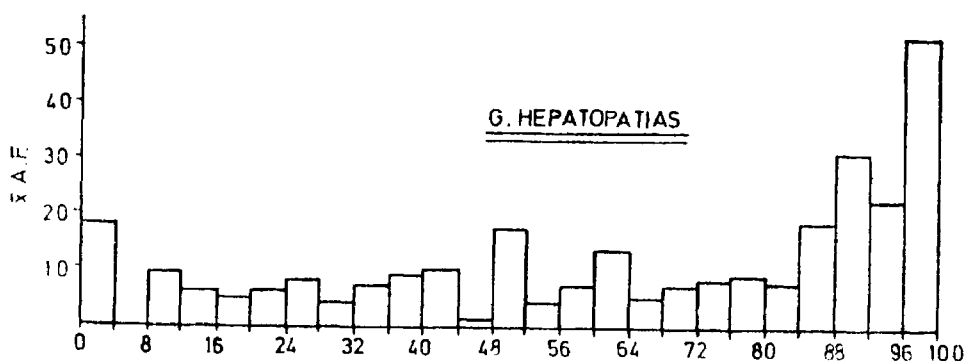
Cuyos diagramas correspondientes se muestran a continuación:



Puede observarse en la tabla y diagramas que las bandas en los geles de sueros patológicos con hepatopatías se sitúan preferentemente en determinadas zonas del gel los cuales se indica a continuación:

- En el primer tercio del gel, zona catódica, predominan bandas correspondientes a desórdenes de tipo obstructivo y crónico.
- En la zona del 64 al 88% del recorrido de la banda anódica, se sitúan preferentemente bandas pertenecientes a trastornos por enfermedades obstructivas.
- En la franja comprendida entre el 88 y 92%, se asientan bandas de sueros con alteraciones hepáticas clasificadas como crónicas y agudas.
- Próxima a la banda de mayor movilidad, entre 92 y 96% del recorrido, aparece una banda destacada en el grupo de las perturbaciones obstructivas, banda que ya ha sido mencionada por algunos autores y que se confirma en este trabajo.

Los valores medios de las actividades fosfatásicas de las bandas en los geles de los sueros estudiados, con indicación de su dispersión, se muestra en la siguiente tabla:



Actividad fosfatásica de las bandas de los peles en las Hepatopatías

Extr. intv.: Extremos de los intervalos del recorrido de la banda anódica

\bar{x} (AF): Valor medio de la actividad fosfatásica de las bandas

D.S.: Desviación standard de la media de la AF

Extr.	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96
intv.	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96	100

HEPATOPATIAS EN GENERAL

\bar{x} (AF)	18	-	9	6	5	6	8	4	7	9	10	1	17	4	7	13	5	7	8	9	8	10	31	23	52
D.S.	11	-	6	4	4	4	6	4	3	-	6	-	3	2	5	0	4	3	3	8	6	13	15	12	22

AGUDAS

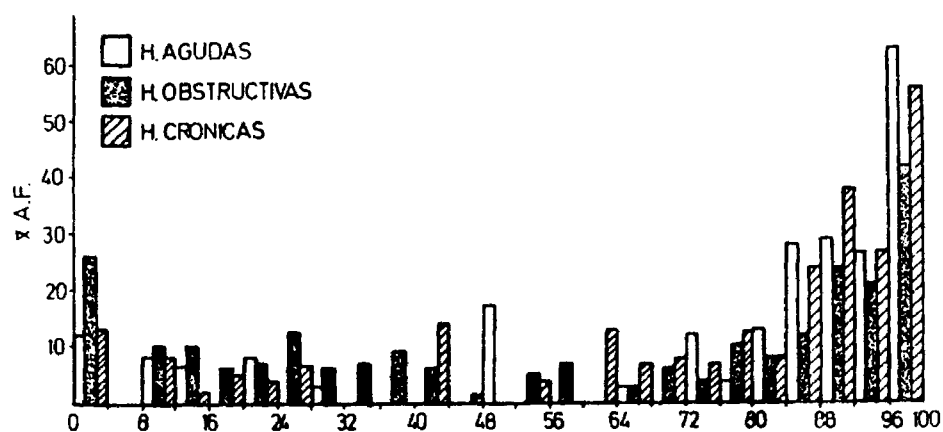
\bar{x} (AF)	12	-	8	6	-	8	4	3	-	-	-	-	17	-	-	-	3	-	12	4	13	28	29	26	63
D.S.	7	-	-	-	-	6	-	0	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	2	13	12	12	8	23

OBSTRUCTIVAS

\bar{x} (AF)	26	-	10	10	6	7	12	5	7	9	5	-	-	5	7	-	3	6	4	10	8	11	24	21	42
D.S.	10	-	7	2	6	1	7	6	3	-	-	-	-	3	5	-	1	3	1	7	4	10	15	11	15

CRONICAS

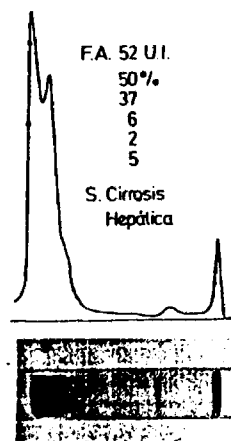
\bar{x} (AF)	13	-	8	2	5	4	6	-	-	-	14	1	-	4	-	13	7	8	7	13	8	24	38	27	56
D.S.	8	-	3	0	4	4	3	-	-	-	-	-	-	2	-	0	5	3	2	13	5	11	13	17	22



La actividad fosfatásica en las fracciones electroforéticas de los procesos patológicos hepáticos difiere del modelo de sueros normales en que se encuentra bastante aumentada la banda catódica así como un desplazamiento de la actividad fosfatásica hacia esta zona.

En los tres grupos de las hepatopatías se advierten diferencias significativas sobre todo entre las obstructivas y los otros dos grupos. Así, en las obstructivas se encuentra muy acentuado el tamaño de la banda catódica y A.F. de esta región.

En los otros dos grupos se observa cierta analogía, si bien en los procesos agudos la banda de mayor actividad es la anódica y en las crónicas la posición preferente corresponde a la zona del 88 al 92%.



5.3.2. Sueros de enfermedades óseas

El número de sueros con afecciones óseas es de 25 casos, muestra relativamente pequeña pero suficiente para el propósito de este trabajo. En las osteopatías se ha fijado la atención en enfermos con Paget por considerarlos más característicos, unido a que presentan alta actividad fosfatásica; dentro de este grupo se ha tenido en cuenta aquellos casos en plena actividad, 14 sueros, y una fracción más pequeña, de tres sueros, en periodo de inactividad.

Como un muestrario se estudian otras alteraciones óseas tales como artritis reumatoide, artrosis, escoliosis, hiperparatiroidismo, hipercalcemia, raquitismo e hipofosfatasa familiar.

Aún cuando los niños, desde ningún punto de vista se pueden considerar que presenten afecciones óseas, se acepta que su me

tabolismo óseo es muy activo con una fosfatasa alcalina elevada, muy superior a lo normal en los adultos, y por ello, es costumbre por los investigadores incluirlos en este grupo. Forman una fracción de 16 sueros de niños de edades comprendidas entre 2 y 14 años.

El valor medio de la fosfatasa alcalina con su dispersión en las diversas osteopatías se muestran en el cuadro general. Destaca el valor, casi normal, de la F.A. de la enfermedad de Paget en situación de inactividad.

En los geles, el número de bandas en estos sueros patológicos se aparta también de la distribución de frecuencias de los sueros normales. Con dos bandas no aparecen en ningún gel, siendo tres bandas lo más corriente, como se muestra en el siguiente cuadro:

<u>Nº de bandas</u>	<u>Totalidad de sueros pat.</u>	<u>E. Paget</u>	<u>Resto de sueros</u>	<u>Niños</u>
2	-	-	-	2
3	9	6	3	11
4	5	4	1	3
5	6	5	1	-
6	5	2	3	-
	<hr/>	<hr/>	<hr/>	<hr/>
	25	17	8	16

En el cuadro siguiente se muestra la frecuencia de las bandas en cada zona de los geles y a continuación los diagramas de todo el grupo y en forma combinada los diagramas con la enfermedad de Paget y niños sanos.

Posición de las bandas en peles en osteopatías y niños sanos

Extr. intv.: Extremos de los intervalos del recorrido de la banda anódica

f.: frecuencias de las bandas

fr%: frecuencia relativa x 100

Extr.	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96
intv.	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96	100

ALTERACIONES OSEAS

Todas las bandas

f.	25	-	2	1	2	1	2	-	2	1	-	-	1	-	2	-	5	5	2	2	1	4	18	6	25
fr%	23,4	-	1,8	0,9	1,8	0,9	1,8	-	1,8	0,9	-	-	0,9	-	1,8	-	4,5	4,5	1,8	1,8	0,9	3,6	16,4	5,5	23,4

ENF. PACET

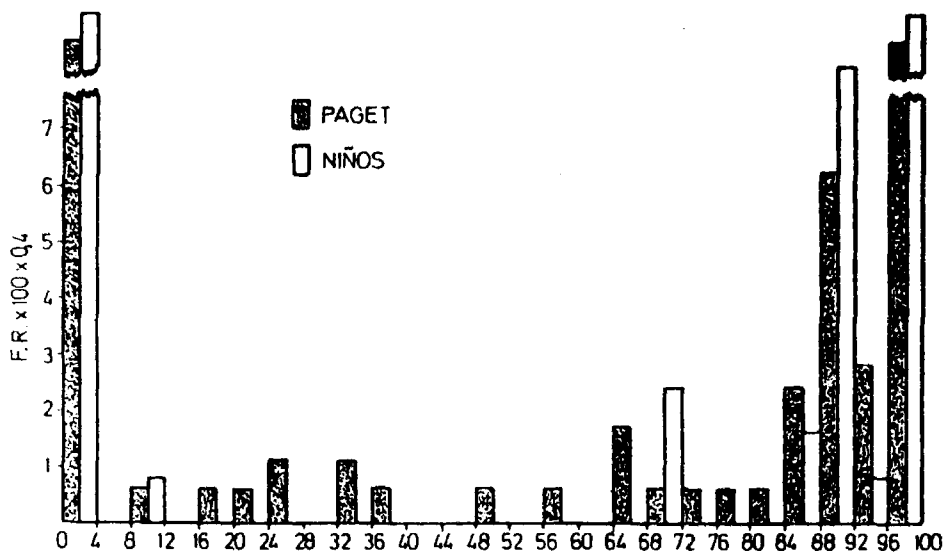
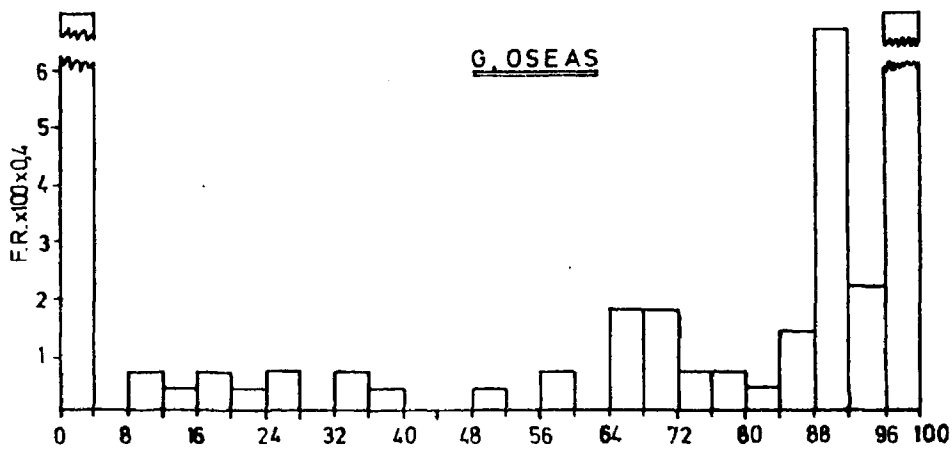
Todas las bandas

f.	17	-	1	-	1	1	2	-	2	1	-	-	1	-	1	-	3	1	1	1	1	4	11	5	17
fr%	24,0	-	1,4	-	1,4	1,4	2,8	-	2,8	1,4	-	-	1,4	-	1,4	-	4,2	1,4	1,4	1,4	1,4	5,6	15,6	7,0	24,0

NIÑOS SANOS

Todas las bandas

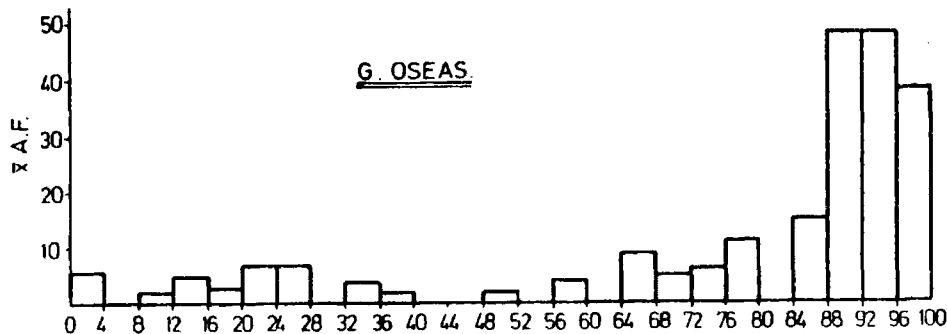
f.	16	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	2	10	1	16
fr%	32,7	-	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,1	-	-	-	-	4,0	20,4	2,0	32,7



De los resultados anteriores pueden hacerse las observaciones siguientes:

- La banda intermedia más frecuente en todas las alteraciones óseas se encuentra en la zona comprendida entre el 88 y 92% del recorrido en forma muy neta y destacada.
- En sueros con enfermedad de Paget, asimismo, aparece destacada la banda antes mencionada.
- En niños también aparece en forma solitaria la banda característica de los procesos óseos, aún cuando su etiología es distinta.
- El modelo posicional de bandas de sueros normales y de osteopatías presentan diferencias muy marcadas que pueden servir al diagnóstico diferencial.

Las actividades fosfatásicas de las bandas de los geles se presentan a continuación así como los diagramas correspondientes.



ACTIVIDAD FOSFATASICA DE LOS CELES EN OSTEOPATIAS Y NIÑOS

Valor medio de la AF en relas en alt. oseas y niños

Extr. intrv.: Extremos de los intervalos del recorrido de la banda anódica

\bar{x} (AF): Valor medio de la actividad fosfatásica de las bandas

D.S.: Desviación standard de la media de AF.

Extr.	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96
intrv.	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96	100

ALTERACIONES OSEAS

Todas las bandas

\bar{x} (AF)	6	-	2	5	3	7	7	-	4	2	-	-	2	-	4	-	9	5	6	11	2	15	48	48	38
D.S.	3	-	1	-	1	-	6	-	1	-	-	-	-	-	2	-	3	4	4	1	-	8	10	10	13

ENF. PAGET

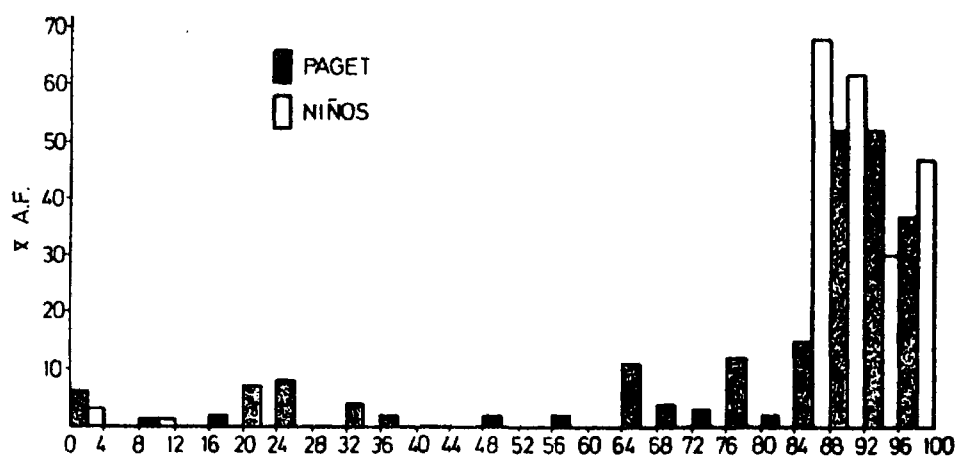
Todas las bandas

\bar{x} (AF)	6	-	1	-	2	7	8	-	4	2	-	-	2	-	2	-	11	4	3	12	2	15	52	52	37
D.S.	2	-	-	-	-	-	6	-	1	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	8	6	17	14

NIÑOS SANOS

Todas las bandas

\bar{x} (AF)	3	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	68	62	30	47
D.S.	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	1	8	-	27



Se observa:

- Lo que caracteriza el espectro electroforético isoenzimático en las enfermedades óseas es la aparición de una banda de gran actividad fosfatásica, generalmente de base ancha, situada en la zona del 88 al 96%. Esta banda presenta mayor actividad que la banda anódica y por tanto constituye la de mayor actividad.
- En niños sanos, igualmente aparece la misma banda si bien generalmente es de forma más aguda, posiblemente de origen más homogéneo.
- La banda catódica, comparativamente, tiene pequeña actividad.
- Los anteriores resultados ponen de manifiesto que la banda o bandas situadas en la zona comprendida del 84 al 96% del recorrido de la banda anódica en el gel, corresponde a la fracción ósea.

5.3.3. Sueros de enfermos con pancreatitis

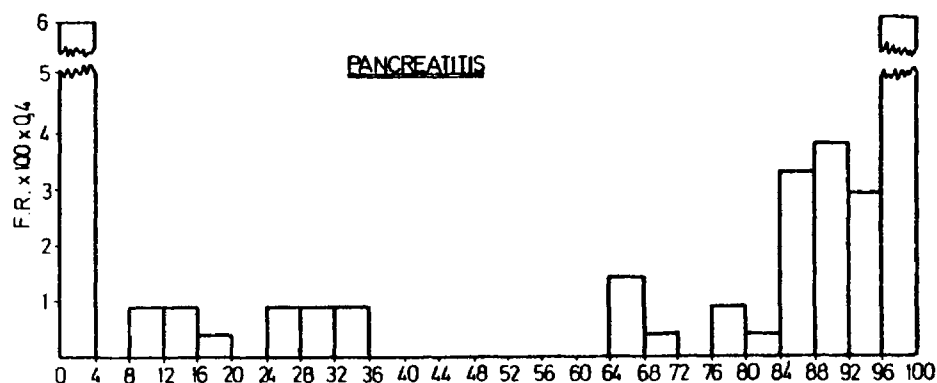
La fosfatasa alcalina, en las pancreatitis, es algo superiores a la de los sujetos normales y, por ello, se han incorporado a este estudio por si presentan alguna característica en el espectro electroforético de los geles y que pudieran ser de utilidad en el diagnóstico diferencial.

Forman un grupo de 23 sueros con una actividad fosfatásica de 57 U.I. como media y una desviación standard de 36 U.I.

En los geles, el número de bandas se aparta también del modelo de sueros normales y sigue la línea de los sueros patológicos en los que la máxima frecuencia de bandas se encuentra en 3 y 4.

Número de bandas	2	3	4	5	6	7
Frecuencia	3	8	8	1	2	1

A continuación se presentan los cuadros con los resultados y gráficos con la distribución de frecuencias de la posición de las bandas en el gel.



ACTIVIDAD FOSFATASICA DE LAS BANDAS DE ENFERMOS CON PANCREATITIS

Extr. intv. : Extremos de los intervalos del recorrido de la banda anódica

x(AF) : Valor medio de la actividad fosfatásica de las bandas

D.S. : Desviación standard del valor medio de la AF

Extr.	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96
intv.	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96	100
x(AF)	14	-	3	4	2	-	9	6	9	-	-	-	-	-	-	-	2	1	-	6	5	10	26	30	62
D.S.	7	-	1	4	-	-	9	3	2	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	1	-	6	16	16	19

POSICION DE LAS BANDAS EN GELLES DE ENFERMOS CON PANCREATITIS

Extr. intv. : Extremos de los intervalos del recorrido de la banda anódica

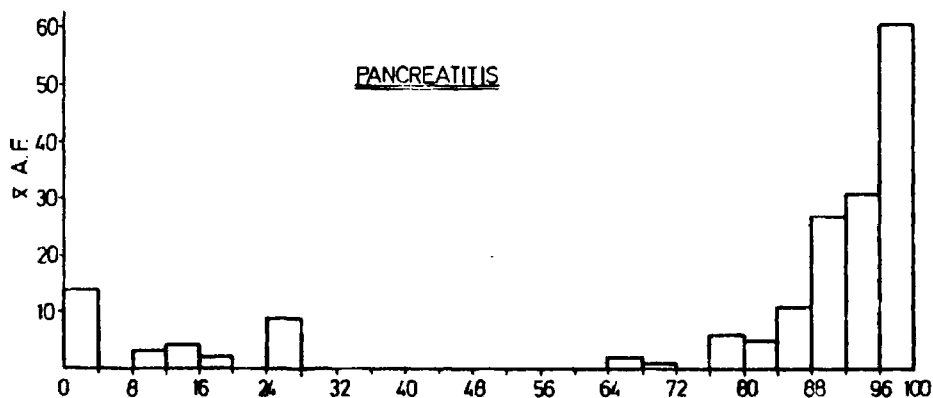
f. : Frecuencia de las bandas en el intervalo

f.r.% : Frecuencia relativa x 100

Extr.	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96
intv.	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96	100
f.	23	-	2	2	1	-	2	2	2	-	-	-	-	-	-	-	3	1	-	2	1	7	8	6	23
f.r.	27,2	-	2,3	2,3	1,1	-	2,3	2,3	2,3	-	-	-	-	-	-	-	3,5	1,1	-	2,3	1,1	8,3	9,5	7,2	27,2

Se observa que las bandas intermedias se sitúan preferentemente en la zona cuyos intervalos son del 84 al 96% del recorrido total.

La actividad fosfatásica de estas bandas aparecen en el cuadro y diagrama siguiente:



Como único comentario puede decirse que la mayor actividad se encuentra en las bandas anódicas y catódicas, recordando a un modelo hepático.

5.3.4. Sueros de enfermedades renales

El riñón es un órgano rico en la producción de enzimas fosfatásicas y en consecuencia es corriente que sea objeto de estudios sobre sus isoenzimas. En este trabajo, la muestra está formada por 117 sueros de diversos desórdenes renales con una gran preponderancia de las insuficiencias renales crónicas, las cuales comprenden 97 casos. Constituyendo pequeños subgrupos también se han conside-

rado de interés otras nefropatías como glomerulonefritis, pielonefritis, fracaso renal agudo, litiasis y trasplantes.

Los valores medios de la fosfatasa alcalina figuran en el cuadro general de sueros patológicos. Destaca la gran actividad del F.R.A. con una F.A. que sobrepasa las 300 U.I.; las demás afecciones presentan una media algo superior al límite máximo de los sueros normales. En general, la dispersión de los valores es alta.

El número de bandas en los geles, en este tipo de sueros, también tiene una frecuencia máxima de 3 a 4 bandas, confirmándose esta característica de los sueros patológicos, si bien los geles con dos bandas tienen bastante incidencia.

<u>Número de bandas</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	
Frecuencia	22	34	31	24	6	(117)

Dado el elevado número de casos de I.R.C., constituye la parte principal de este estudio, si bien figuran otros grupos con menor causística.

La posición de las bandas en los geles, es la siguiente:

Posición de las bandas en reles

Extr. intv.: Extremos de los intervalos del recorrido de la banda anódica

f.: frecuencia de las bandas

fr%: frecuencia relativa x 100

Extr.	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96
intv.	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96	100

ENFERMOS RENALES

Todas las bandas

F.	117	-	2	1	3	9	5	3	3	2	1	1	2	4	6	1	6	14	8	12	12	13	65	17	117
fr%	27,5	-	0,5	0,2	0,7	2,1	1,2	0,7	0,7	0,5	0,2	0,2	0,5	0,9	1,4	0,2	1,4	3,3	1,9	2,8	2,8	3,115,3	4,1	27,6	

I.C.R.

Todas las bandas

F.	97	-	2	-	2	8	3	3	2	2	-	1	2	3	6	1	6	13	6	10	9	11	59	11	97
fr%	27,5	-	0,6	-	0,6	2,2	0,8	0,6	0,6	0,6	-	0,3	0,6	0,8	1,7	0,3	1,7	3,7	1,7	2,8	2,5	3,116,4	3,1	27,5	

GLOMERULONEFRITIS

f.	6	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	1	-	3	6
fr%	27,4	-	-	-	-	4,5	-	-	-	-	4,5	-	-	-	-	-	-	-	-	9,0	9,0	4,5	-	13,7	27,4

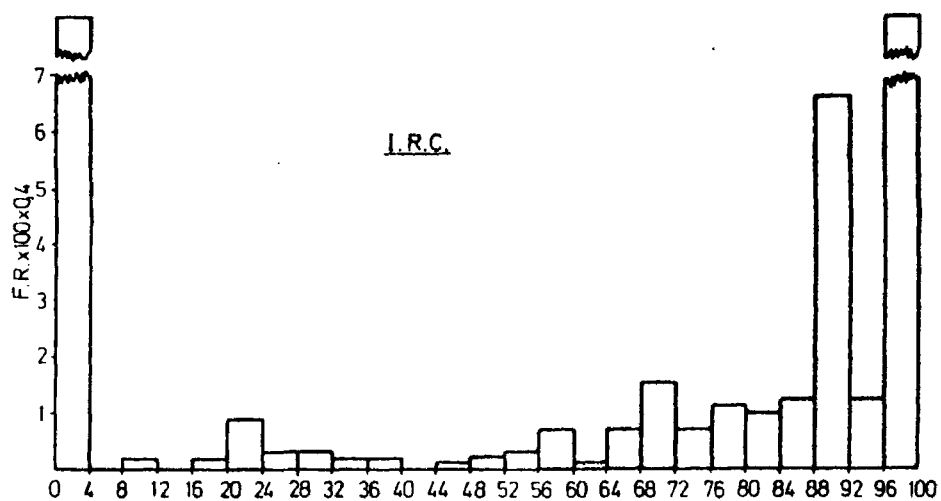
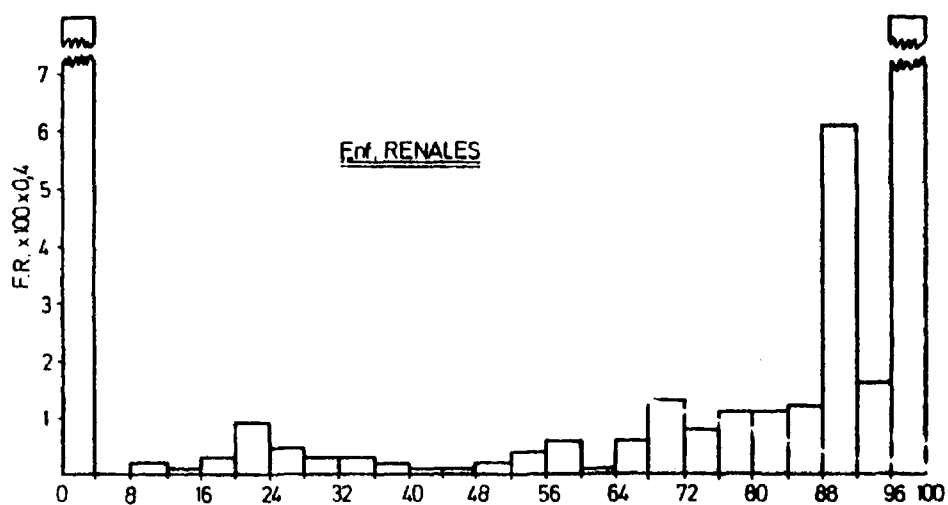
PIELONEFRITIS

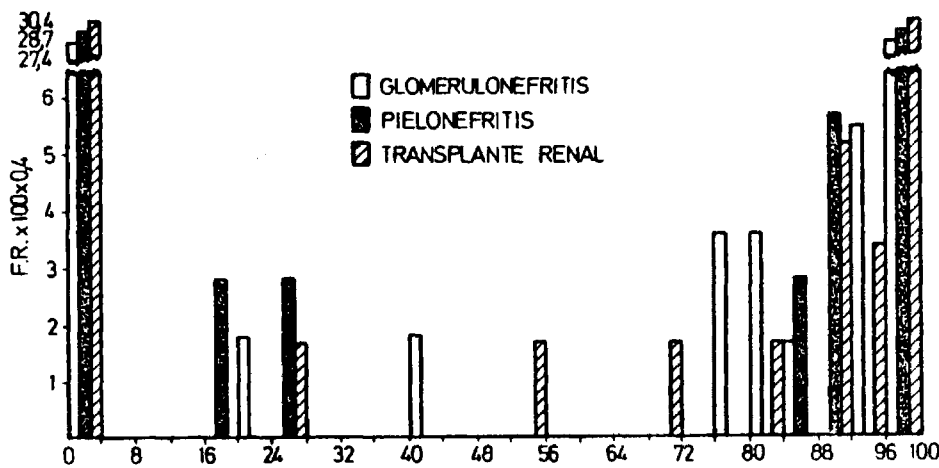
f.	4	-	-	-	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	4
fr%	28,7	-	-	-	7,1	-	7,1	-	7,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,114,2	-	28,7	

TRANSPLANTE RENAL

f.	7	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	1	-	3	2	7
fr%	30,4	-	-	-	-	4,3	-	-	-	-	-	-	-	4,3	-	-	-	4,3	-	-	4,3	-	13,0	8,6	30,4

Los histogramas correspondientes a todas las enfermedades renales e I.R.C. son:





Se observa que la posición preferencias de las bandas en los geles en las enfermedades renales es la siguiente:

- Destaca una banda en la región anódica que puede identificarse como fracción ósea.
- El espectro electroforético se diferencia del modelo correspondiente a las osteopatías en que aparecen bandas, con mayor o menor frecuencia, en otras regiones del gel.
- En nuestra muestra, por predominar los casos de I.R.C., los espectros de éste y el general son muy parecidos.

ACTIVIDAD FOSFATASICA DE LOS GELES EN LAS ENFERMEDADES RENALES

Extr. intrv.: Extremos de los intervalos del recorrido de la banda anódica

$\bar{x}(a.F.)$: Valor medio de la actividad fosfatásica de las bandas.

D.S.: Desviación standard de la media de la AF

Extr.	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96
intrv.	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96	100

ENFERMOS RENALES

Todas las bandas

\bar{x} (AF)	11	-	3	9	3	5	4	4	3	2	2	7	9	5	10	2	11	10	8	11	13	22	35	28	56
D.S.	7	-	0	-	1	3	2	2	1	1	-	-	1	3	8	-	6	9	3	7	10	13	12	9	21

I.R.C.

Todas las bandas

\bar{x} (AF)	11	-	3	-	2	5	4	4	2	2	-	7	9	3	10	2	11	11	8	12	15	22	35	25	57
D.S.	7	-	0	-	0	3	3	3	0	1	-	-	1	2	8	-	6	9	4	7	11	13	7	11	21

GLOMERULONEFRITIS

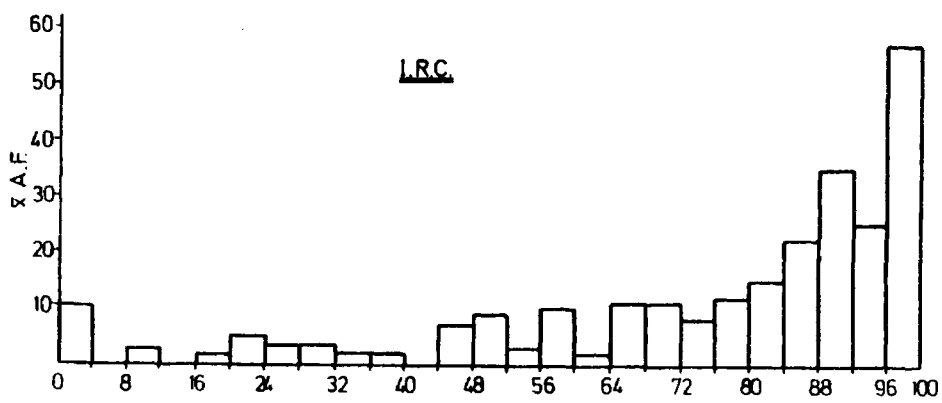
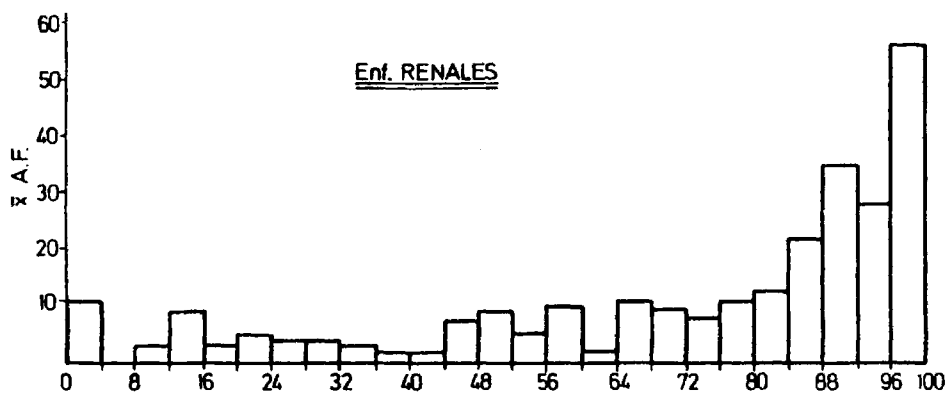
\bar{x} (AF)	14,7	-	-	-	-	2	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2	7,5	22	-	37	58,2
D.S.	8,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	3,5	-	-	7,0	25,6

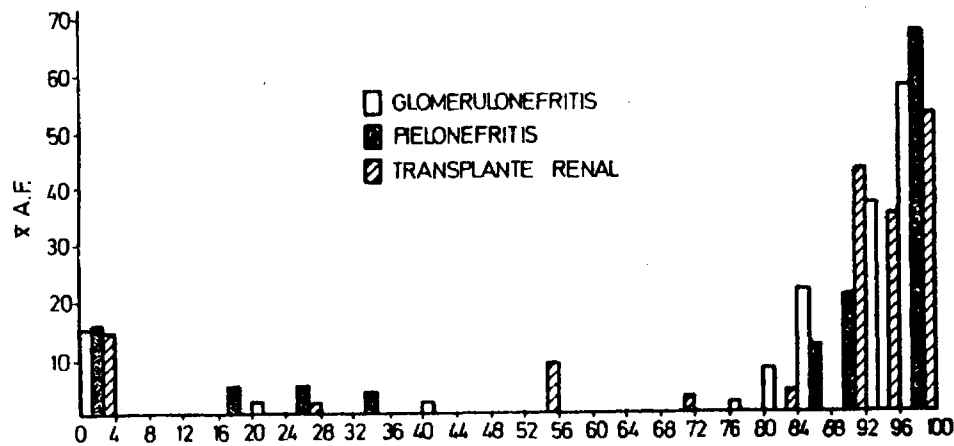
PIELONEFRITIS

\bar{x} (AF)	16,3	-	-	-	5	-	5	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	20	-	67,0
D.S.	6,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	-

TRANSPLANTE RENAL

\bar{x} (AF)	15,4	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	3	-	-	4	-	43,3	35	53,4
D.S.	4,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,6	11,3	18,6





De los resultados obtenidos en la actividad fosfatásica de las bandas de los geles, se puede decir:

- En las enfermedades renales la banda catódica presenta una actividad fosfatásica algo superior al modelo de sueros normales.
- La banda predominante en estos espectros, la fracción ósea, si bien tiene bastante actividad, siempre es inferior a la banda anódica. lo cual puede servir como diferencia de las enfermedades óseas en actividad.
- Otra diferencia con respecto al modelo óseo es la existencia de bandas situadas en la zona intermedia del gel.
- El espectro de la pielonefritis recuerda a procesos hepáticos.

5.3.5. Sueros con enfermedades pulmonares

El pulmón también es un órgano rico en fosfatasa alcalina. La muestra para este estudio está constituida por 45 sueros de enfermos con afecciones pulmonares, en las que predominan la bronquitis obstructiva crónica con 20 casos, seguido de 10 sueros de tuberculosos y 6 enfermos con neumonía. Completan la muestra alguunos casos de embolismo, asma, bronquiectasia y pneumotorax.

En estas enfermedades la fosfatasa alcalina tiene un valor medio de 64 U.I. algo superior a los sueros normales. Destaca la neumonía con 72 U.I. y la B.O.C. con 63. Puede señalarse que la dispersión de los valores de F.A. es relativamente baja.

Respecto al número de bandas en el gel de acrilamida, la frecuencia mayor se encuentra, como en todos los sueros patológicos, en 3 y 4 bandas.

<u>Número de bandas</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
Frecuencia	6	17	13	8	1

Las bandas intermedias en el gel se encuentran posicionadas preferencialmente según el cuadro e histograma siguientes, en el que además de la general de enfermedades pulmonares se especifican las afecciones de mayor incidencia y valor de la F.A.

Posición de las bandas en geles en alteraciones pulmonares

Extr. intv.: Extremidad de los intervalos del recorrido de la banda anódica

f.: frecuencia de las bandas

fr %: frecuencia relativa x 100.

Extr.	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96
intv.	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96	100

ENFERMEDADES PULMONARES

Todas las bandas

f.	45	-	1	4	4	2	-	-	1	-	1	-	-	-	1	-	1	3	-	5	5	17	19	45
fr %	29,3	-	0,6	2,6	2,6	1,2	-	-	0,6	-	0,6	-	-	-	0,6	-	0,6	1,9	-	3,3	3,3	11	12	29,3

BRONQUITIS OBSTRUCTIVA CRÓNICA

Todas las bandas

f.	20	-	-	3	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	3	8	7	20
fr %	29,0	-	-	4,3	4,3	2,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,3	-	-	4,3	11,7	10,0	29,0

NEUMONIA

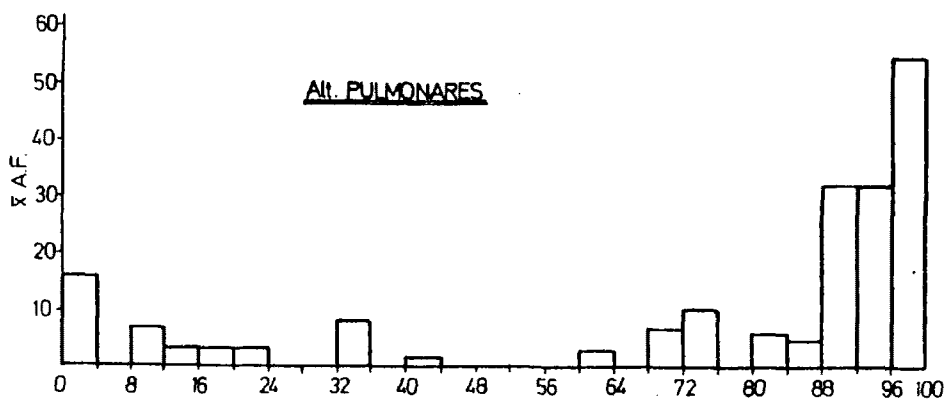
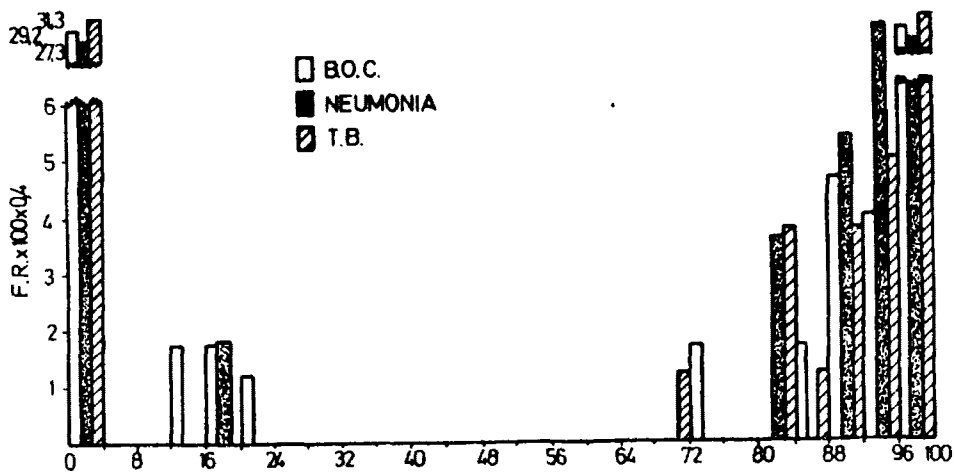
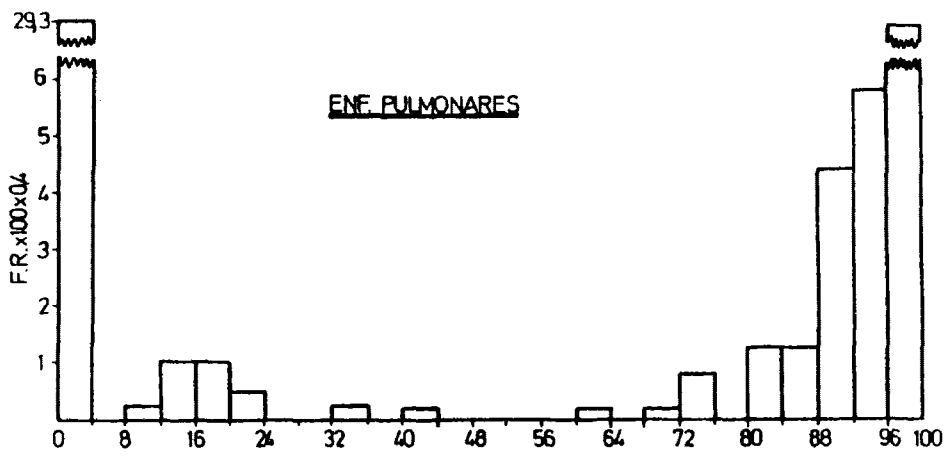
Todas las bandas

f.	6	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	3	4	6
fr %	27,3	-	-	-	4,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,1	-	13,6	18,2	27,3

TUBERCULOSIS PULMONAR

Todas las bandas

f.	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	3	1	3	4	10
fr %	31,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,1	-	-	9,4	3,1	9,4	12,5	31,3



Pudiéndose extraer lo siguiente:

- Comparado el histograma de las enfermedades pulmonares con el modelo de los sueros normales, se advierte que se halla aumenta da la frecuencia en la posición correspondiente del 88-82% del recorrido de la banda anódica, es decir, en la posición de la fracción ósea.
- En neumonias, la banda predominante se sitúa próximo a la banda anódica.
- En las bronquitis obstructivas crónicas, el aspecto es algo diferente, aparecen bandas en el primer tercio del gel.
- En la tuberculosis y neumonias, cuyos espectros son muy parecidos, puede señalarse cierta analogía con los sueros normales de 3 y 4 bandas con un aumento en la frecuencia en la posición 80-84%.

La actividad fosfatásica media de las bandas se indica en el siguiente cuadro y gráficos, en los que se sigue el mismo esquema.

ACTIVIDAD FOSFATASICA DE LOS GELES EN ALTERACIONES PULMONARES

Valor medio de la AF en geles con alt. pulmonares

Extr. intrv.: Extremos de los intervalos del recorrido de la banda anódica

\bar{x} (AF): Valor medio de la actividad fosfatásica de las bandas

D.S.: Desviación standard de la media de AF.

Extr.	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96
intrv.	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96	100

ENFERMEDADES PULMONARES

Todas las bandas

\bar{x} (AF) 16 - 7 3 3 3 - - 8 - 2 - - - - 3 - 7 10 - 6 5 32 32 55

D.S. 10 - - 1 2 2 - - - - - - - - - 8 - 3 1 15 11 19

BRONQUITIS OBSTRUCTIVAS CRONICAS

Todas las bandas

\bar{x} (AF) 19 - - 4 3 4 - - - - - - - - - 10 - - 5 24 30 67

D.S. 8 - - 1 2 2 - - - - - - - - - 8 - - 1 11 6 18

NEUMONIA

Todas las bandas

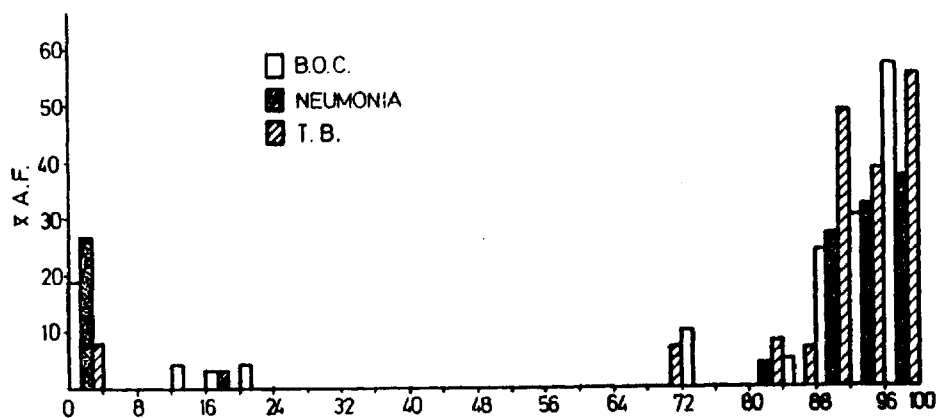
\bar{x} (AF) 27 - - - 3 - - - - - - - - - - - - - 1 - 27 32 17

D.S. 12 - - - - - - - - - - - - - - - 0 - 12 15 11

TUBERCULOSIS PULMONAR

\bar{x} (AF) 8 - - - - - - - - - - - - - 7 - - 8 7 49 37 45

D.S. 5 - - - - - - - - - - - - - 3 - 16 7 10



Se observa:

- El espectro electroforético del gel se caracteriza por un aumento del área de la banda catódica, doble que la correspondiente del suero normal. El resto del espectro es muy semejante al modelo de los sueros normales.
- El B.O.C. y neumonias, la banda catódica presente gran actividad, unas tres veces que los sueros normales.
- En tuberculosis, la actividad de la banda situada en el 88-92% del recorrido de la banda anódica, es muy alta.

5.3.6. Sueros de neoplasias

Las neoplasias constituyen un grupo importante de alteraciones patológicas con niveles elevados de fosfatasa alcalina, lo cual justifica su inclusión en este trabajo. Como es bien sabido,

los procesos cancerosos son muy heterogéneos y para su estudio han sido propuestas varias clasificaciones. En este estudio, se han agrupado estos desórdenes atendiendo a criterios anatomopatológicos siguiendo las indicaciones de la I del C.(ANDERSON, 1971). De acuerdo a esos criterios, la clasificación se hace teniendo en cuenta el tejido afectado.

El número total de sueros estudiados con neoplasias es de 81, que clasificados según el criterio anterior se muestran en la siguiente tabla. En ella se incluye el número de casos de cada grupo, el valor medio de la fosfatasa alcalina en U.I. y variabilidad de la misma.

TUMORES ESTUDIADOS Y F.A.

- Tumores tejido epitelial	<u>n</u>	<u>\bar{x}(F.A.)</u>	<u>D.S.</u>
Ca. pulmón	9	44	16
Ca. mama	13	55	25
Hepatoma	6	182	123
Ca. páncreas	3	214	26
colon	6	64	50
gástrico	8	128	134
Esófago	2	28	7
Pene	1	44	-
Próstata	14	119	144
Vesical	5	45	12
Tiroides	2	43	25
- Tumores der. de la cresta neural			
Melanoma	1	41	-
- Tumores der. del tej. conectivo			
Sarcoma de pierna	1	40	-
Histiocitosis con l. óseas	1	31	-
- Tumores der. del tej. linfoide y hematopoyético			
Hodgkin	1	70	-
Linfoma	3	115	10
Mieloma	5	133	185

- Para un estudio conjunto se ha considerado de utilidad reagrupar determinadas enfermedades cancerosas por afinidades de órganos. Según:

<u>Agrupaciones</u>	<u>n</u>	<u>\bar{x} (FA en UI)</u>	<u>D.S.</u>
Gen. de enf. cancerosas	81	94	103
Linfomas	9	120	130
Ca. Org. genitales	28	86	101
Ca. Org. digestivos	24	123	112
Ca. pulmón	9	44	16

De los valores de la F.A. de los sueros cancerosos se puede decir:

- La fosfatasa alcalina de las neoplasias, consideradas como un conjunto, es alta, alrededor de 100 U.I. Hay un grupo formado por Ca hepático, páncreas, gástrico, próstata, linfoma y mieloma cuya F.A. supera esa media. Otro grupo constituido por Ca de mama, colon y Hodgkin, supera las 50 U.I. Finalmente, el resto de neoplasias su valor de F.A. es análogo al valor normal.
- La dispersión de la F.A. en los sueros es en general muy alta. Valores más centrados se encuentran en linfoma, Ca vesica, páncreas y pulmón.

El número de bandas, en los geles, tiene su máxima frecuencía en 4 bandas, como sucede en todos los procesos patológicos:

<u>Número de bandas</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
Gen de enf. cancerosos	0	26	29	21	5
Tumores epiteliales	0	22	23	19	5

ACTIVIDAD FOSFATÁSICA DE LAS BANDAS DEL GEL EN ENFERMEDADES DE CÁNCER

Extr. intv.: Extremos de los intervalos del recorrido de la banda anódica

x (AF) : Valor medio de la actividad fosfatásica de las bandas

D.S.: Desviación standard

Extr.	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96
intv.	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96	100

General de enfermedades cancerosas

\bar{x} (AF)	14	-	5	4	6	3	7	-	5	-	-	-	5	-	-	8	-	6	7	6	10	6	32	34	48
D.S.	9	-	3	4	4	2	7	-	3	-	-	-	3	-	-	-	-	5	3	5	9	5	14	14	16

Linfomas

\bar{x} (AF)	16	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	7	-	26	50	46
D.S.	10	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	7	-	16	7	15

Ca. genitales

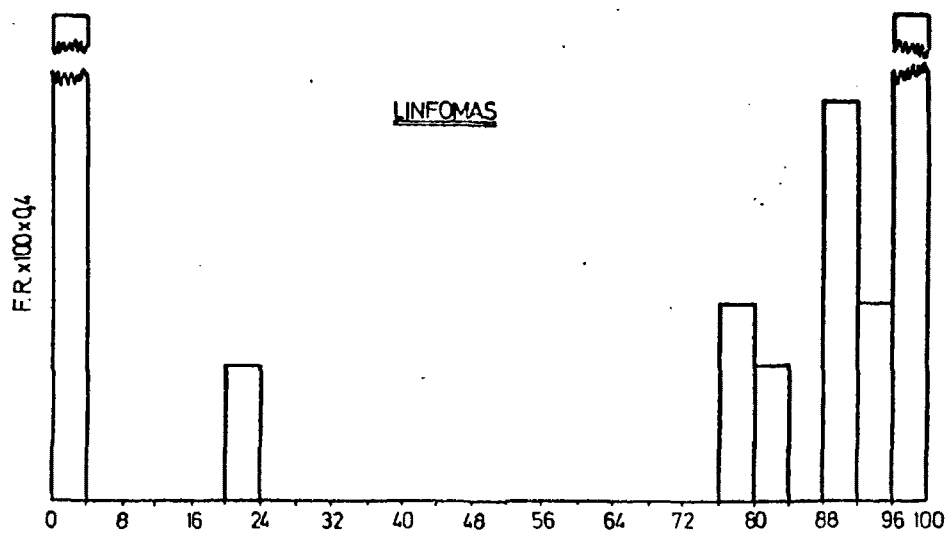
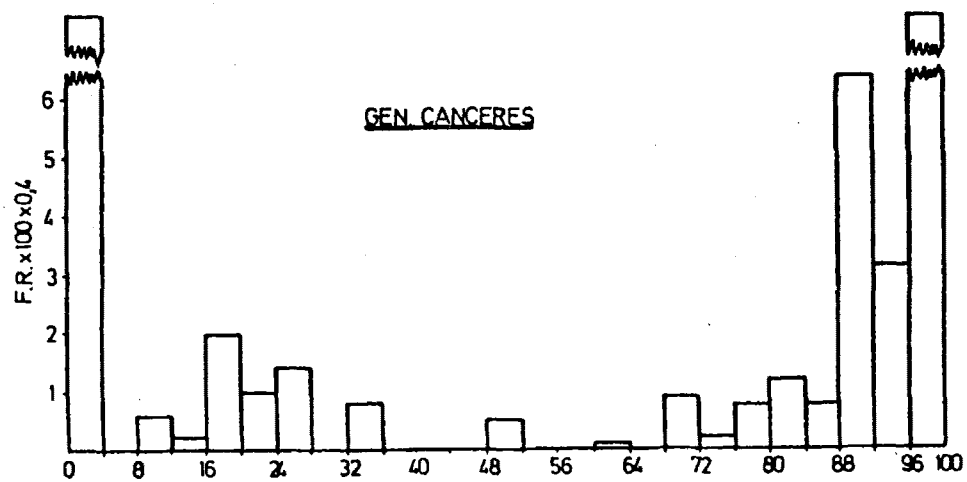
\bar{x} (AF)	14	-	3	-	8	-	6	2	-	-	-	6	-	-	-	8	-	9	-	-	6	1	36	52	46
D.S.	8	-	2	-	7	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	10	13	11

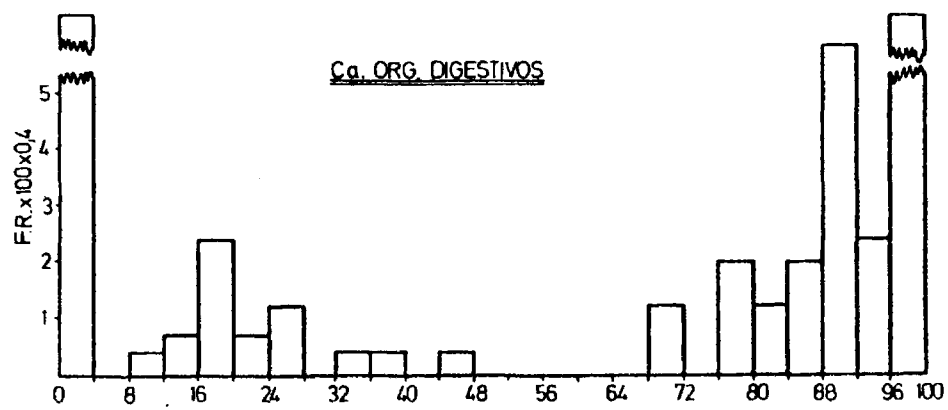
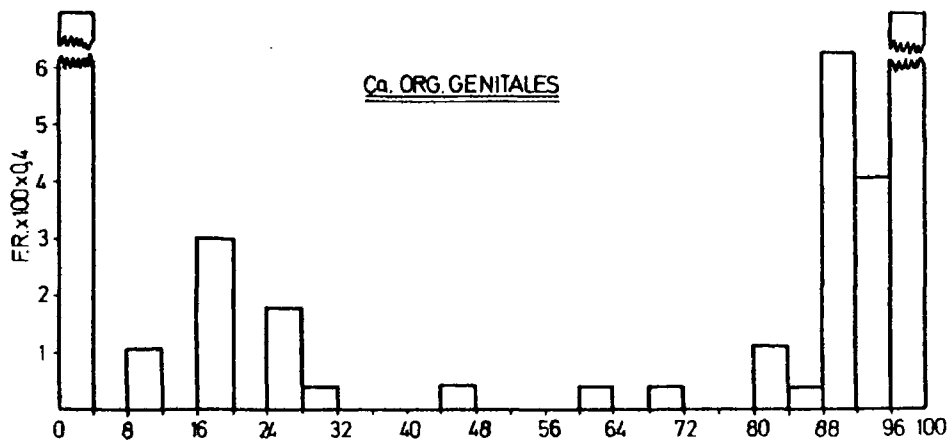
Ca. órganos digestivos

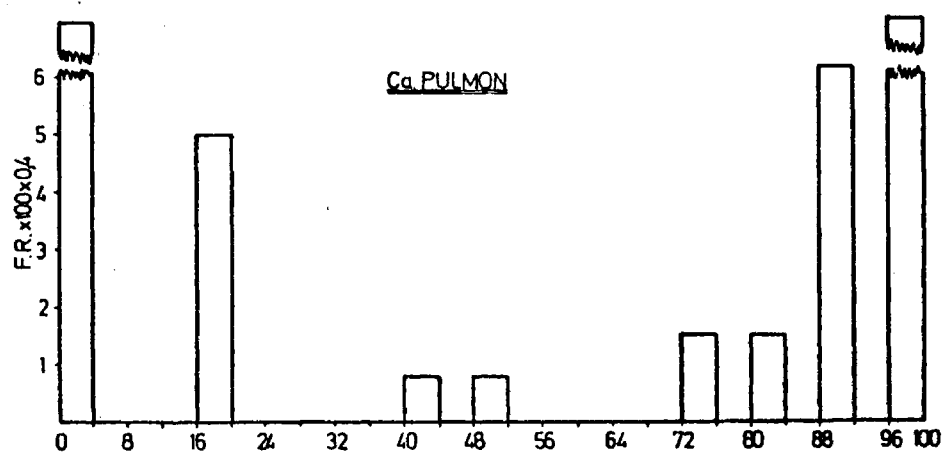
\bar{x} (AF)	16	-	4	7	5	7	6	-	4	4	-	3	-	-	-	-	-	3	-	10	7	16	26	33	43
D.S.	9	-	-	-	5	2	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	11	4	13	12	12	17

Ca. pulmón

\bar{x} (AF)	12	-	-	-	5	-	-	-	-	-	8	-	2	-	-	-	-	-	6	-	5	-	30	37	43
D.S.	8	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	0	-	17	11	16







Se observa en todos los grupos la presencia de una banda de gran frecuencia situada en la zona de la fracción ósea. Asimismo, siempre aparece una banda en el primer tercio del gel, entre los intervalos de 16 y 28% del recorrido: en sueros con afecciones genitales y digestivas, esta banda tiene bastante dispersión. La zona intermedia aparece en general limpia de bandas.

La actividad fosfatásica en el gel se distribuye de esta forma:

POSICION DE LAS BANDAS EN GELES EN ENFERMEDADES DE CANCER

Extr. : Extremos de los intervalos del recorrido de la banda aniónica

f.: frecuencia de las bandas

fr %: frecuencia relativa x 100

Extr.	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96
intv.	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96	100

General de enfermedades cancerosas

f.	81	-	5	2	16	9	11	-	6	-	-	-	4	-	-	1	-	7	2	6	10	6	52	25	81
fr %	25	-	1,5	0,6	4,9	2,5	3,4	-	1,9	-	-	-	1,2	-	-	0,3	-	2,2	0,6	1,9	3,1	1,9	16	7,7	25

Linfomas

f.	9	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2	-	6	3	9
fr %	26,4	-	-	-	-	5,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,8	5,9	-	17,6	8,8	26,4

Ca. genitales

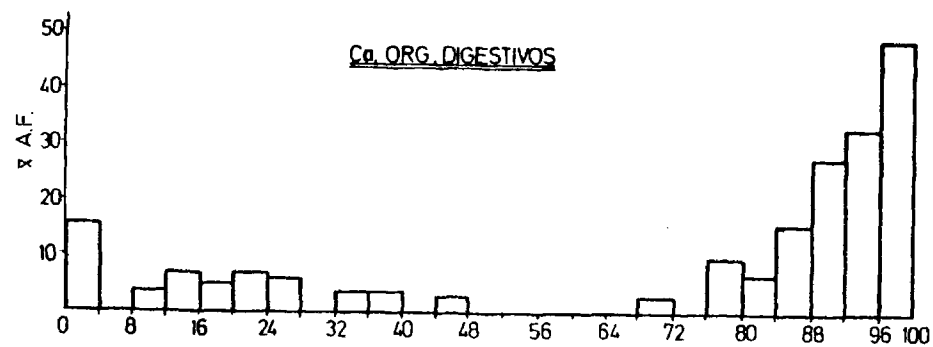
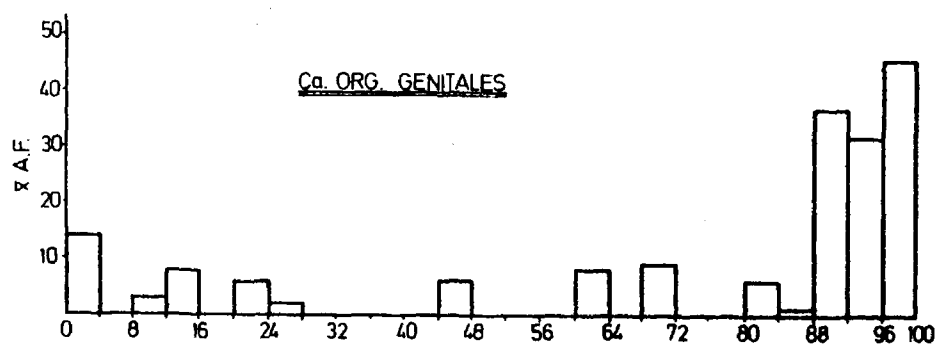
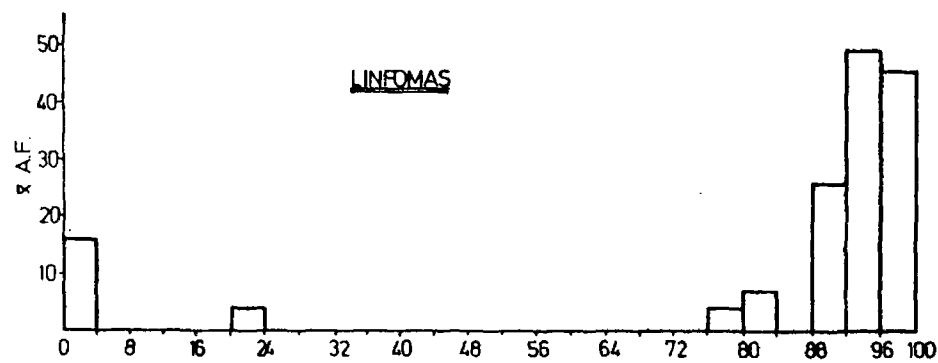
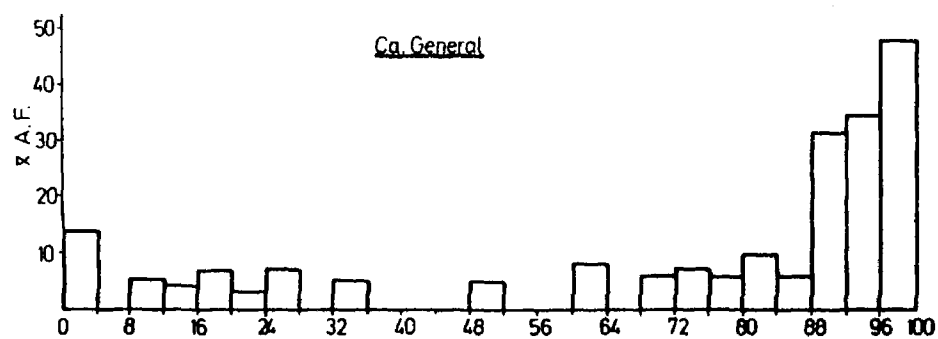
f.	28	-	3	-	8	-	5	1	-	-	-	1	-	-	-	1	-	1	-	-	3	1	17	11	28
fr %	25,9	-	2,8	-	7,4	-	4,6	0,9	-	-	-	0,9	-	-	-	0,9	-	0,9	-	-	2,8	0,9	15,7	10,2	25,9

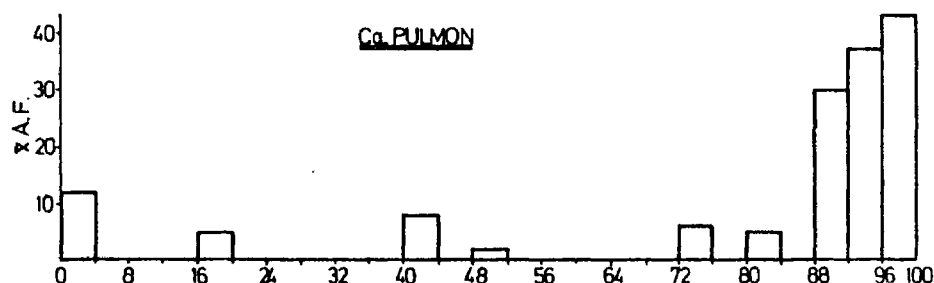
Ca. órganos digestivos

f.	24	-	1	2	6	2	3	-	1	1	-	1	-	-	-	-	-	3	-	5	2	5	15	6	24
fr %	23,7	-	1	1,9	5,9	1,9	2,9	-	1	1	-	1	-	-	-	-	-	2,9	-	4,9	1,9	4,9	14,8	5,9	23,7

Ca. pulmón

f.	9	-	-	-	5	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2	-	2	-	6	4	9
fr %	23	-	-	-	12,5	-	-	-	-	-	2,6	-	2,6	-	-	-	-	-	5,1	-	5,1	-	15,4	10,2	23





La actividad fosfatásica en los geles se distribuye, en nuestra casuística así:

- La banda catódica tiene en todos los grupos un área relativamente bastante elevada, análoga a la que presentan las hepatopatías, pancreatitis y enfermedades pulmonares.
- Respecto a las bandas situadas en el primer tercio del gel, se observan dos modalidades, en una de ellas que comprende los linfomas y Ca. de pulmón, aparecen una banda neta y definida, mientras que en Ca. de órganos genitales y digestivos se encuentran más dispersos. La magnitud de todas estas bandas es superior al modelo normal con un área algo inferior a la mitad de la banda catódica de las neoplasias.
- En la zona intermedia del gel entre 40-52%, aparece, en un 5%, una banda con actividad fosfatásica.
- La forma en que aparecen las bandas en la zona anódica varía con el tipo de la neoplasia, así
 - Los linfomas recuerdan a las osteopatías; una banda que sobresale a la banda anódica.

- En los geles de Ca de órganos genitales y pulmón, la banda cercana a la anódica tiene un área inferior a esta.
- En neoplasias de órganos digestivos, la banda anódica presenta un área mayor que el resto de los otros tumores y además de las bandas, ya mencionadas, del primer tercio, se encuentran otras en el tercio anódico análogas a las hepatopatías.
- Con una casuística mayor de sueros cancerosos, y estudiados en grupos pequeños, posiblemente se podrían observar diferencias en la distribución y actividad de las bandas en el gel.

5.3.7. Estudio de mezclas de sueros patológicos

En los apartados 5.2.4. y 5.2.5. se estudiaron mezclas de homogenados y de homogenados y sueros normales, observándose que se producían anomalías en los valores de la fosfatasa alcalina así como en el espectro isoenzimático de los geles. Se continúa éste estudio con mezclas de sueros patológicos.

Se sigue la misma metodología experimental que la empleada en el apartado 5.2.4., o sea, verificar los ensayos tanto de los componentes como de la mezcla en forma simultánea para que los errores sean análogos en cada serie y los resultados puedan ser comparados. La única diferencia existente es que los sueros no han sido congelados, han sido ensayados, casi siempre, en el mismo día de ser extraídos.

Se estudian 13 mezclas, de las cuales, la enfermedad de Paget es uno de los componentes en 12 experimentos.

Los resultados obtenidos respecto a la fosfatasa alcalina

de la mezcla de sueros patológicos figuran a continuación. Se recuerda que la fosfatasa alcalina F.A. se expresa en U.I. y que la F.A. esperada es la media aritmética de los componentes.

FOSFATASA ALCALINA DE MEZCLAS DE SUEROS PATOLOGICOS

Sueros componentes				Mezcla de sueros	
Suero	F.A.	Suero	F.A.	F.A. esperado	F.A. hallado
1 S.H.B.	134	Paget	700	417	347
2 B.O.C.	97	Paget	241	169	166
3 B.O.C.	134	Paget	241	197	151
4 Hepatitis	145	Paget	241	193	209
5 Ict. Obst.	109	Paget	241	175	171
6 Ict. Obst.	41	Paget	241	141	127
7 Cardiop.	95	Paget	241	168	200
8 Cirrosis	53	Neop. gast.	616	335	549
9 I.R.C.	44	Paget	700	373	793
10 Ad. prost.	82	Paget	241	161	138
11 Neop. gast.	616	Paget	241	429	549
12 Linfoma	209	Paget	241	225	232
13 Mieloma	145	Paget	241	193	206
				Ex = 3166 UI	3838 UI
				\bar{x} = 243	295
				DS = 105	207

El "t de Student" entre los valores de FA esperados y hallados es de 1.38

Comentario:

- Consideradas todas las F.A. de las mezclas de sueros patológicos, los valores hallados de la F.A. superan en un 20% al valor esperado.
- En algunos ensayos, el incremento en FA es muy marcado, como en los ensayos 8, 9 y 11, en los que la FA de algún componente es alta.

- Las diferencias entre el valor esperado y el hallado en la mayoría de los ensayos no pueden justificarse por variabilidad de la metódica. El coeficiente de variabilidad de la precisión en la medida de la fosfatasa alcalina, apartado 4.2.1. es pequeño y los valores obtenidos en los ensayos de mezclas superan con mucho la dispersión de la metódica.
- Aplicado el "t de Student" a los valores medios de FA esperado y hallado, la diferencia no es significativa al nivel 0,05, a pesar de la diferencia existente entre las sumas globales de los valores hallados y esperados, la gran dispersión de las series hace que estadísticamente no sea significativa dicha diferencia.

En geles, la posición de las bandas de la mezcla y sueros componentes figura en el anexo n° 3 del apéndice.

Siguiendo el mismo esquema que en los anteriores estudios sobre mezclas, en la tabla de las hojas siguientes se exponen los resultados obtenidos de la distribución de la actividad fosfatásica en las bandas, en unidades absolutas convencionales.

En casi todas las mezclas, como se ha dicho anteriormente, uno de los componentes es un suero con la enfermedad de Paget, que por contener una banda destacada, la isoenzima ósea, puede servir de referencia.

Considerada cada banda, en los intervalos considerados, la suma global de los valores esperados y hallados de las mezclas, con indicación de las diferencias entre ambos valores y porcentajes de los mismos, es

ACTIVIDADES FOSFATASICAS EN GELES CON SUEROS MEZCLADOS
General de valores esperados y hallados

Posición de bandas de la mezcla	A.F. en UI convencionales			
	V. esp°	V. hall°	Difer.	Porctje
Banda catódica	541.9	683.7	141.8	26.2
" 10-40% del recorrido	131.2	83.0	48.2	36.7
" 50-80 "	322.1	471.4	149.3	46.4
" 80-90 "	1199.6	1357.1	157.5	13.1
" anódica	975.9	1275.7	299.8	30.7
General	£3170.7	£3870.9	699.2	22.1

ACTIVIDAD FOSFATASICA EN GELES DE LAS MEZCLAS DE SUEROS
PATOLOGICOS

<u>N°</u>	<u>Posiciones de las bandas</u>	<u>A.F. de la mezcla</u>		<u>Diferenc.</u>	<u>Porcent.</u>
		<u>Esperado</u>	<u>Hallado</u>		
1	<u>S.H.B. y Paget</u>				
	Banda catódica	43,8	34,7	9,1	20,8
	" 10-40% del recorr.	46,0	3,5	42,5	92,4
	" 50-80 "	43,3	45,1	1,8	4,2
	" 80-90 "	201,4	187,4	14,0	7,0
	" anódica	82,5	48,6	33,9	41,1
		417,0	319,3	97,7	23,4
2	<u>B.O.C. y Paget</u>				
	Banda catódica	26,6	26,6	0	-
	" 10-40% del recorr.	5,8	6,6	0,8	13,8
	" 50-80 "	7,0	0	7,0	-
	" 80-90 "	84,5	93,0	8,5	10,0
	" anódica	46,3	38,2	8,1	17,5
		170,2	164,4	5,8	3,4
3	<u>B.O.C. y Paget</u>				
	Banda catódica	20,5	12,1	8,4	41,0
	" 10-40% del recorr.	4,8	3,0	1,8	37,0
	" 50-80 "	6,0	0	6,0	-
	" 80-90 "	105,1	156,7	51,6	49,0
	" anódica	52,9	36,2	16,7	31,6
		189,3	208,0	18,7	9,9

N°	Posiciones de las bandas	A.F. de la mezcla		Diferenc.	Porcent.
		Esperado	Hallado		
4 <u>Hepatitis y Paget</u>					
	Banda catódica	26,8	29,3	2,5	9,3
	" 10-40% del recorr.	4,8	0	4,8	-
	" 50-80 "	6,0	0	6,0	-
	" 80-90 "	101,6	127,5	25,9	25,5
	" anódica	55,0	48,1	7,4	13,3
		194,2	204,9	10,2	5,2
5 <u>Icter. Obstr. y Paget</u>					
	Banda catódica	18,3	12,0	6,3	34,4
	" 10-40% del recorr.	9,2	5,1	4,1	44,5
	" 50-80 "	8,8	1,7	7,1	80,7
	" 80-90 "	90,2	102,6	12,1	13,4
	" anódica	49,8	51,3	1,5	3,0
		176,3	172,7	3,9	2,2
6 <u>Icter. Obstr. y Paget</u>					
	Banda catódica	20,0	19,1	0,9	4,5
	" 10-40% del recorr.	5,9	2,5	3,4	52,6
	" 50-80 "	6,0	0	6,0	-
	" 80-90 "	60,3	86,4	26,1	43,3
	" anódica	50,5	17,8	32,7	64,7
		142,7	125,8	16,9	11,8
7 <u>Cardiopatía y Paget</u>					
	Banda catódica	34,9	72,0	37,1	10,6
	" 10-40% del recorr.	5,8	6,0	0,2	3,0
	" 50-80 "	6,0	0	6,0	-
	" 80-90 "	75,2	80,0	4,8	6,4
	" anódica	46,6	38,0	8,6	18,4
		168,5	196,0	27,5	16,3
8 <u>Cirrosis y Neop. gástrica</u>					
	Banda catódica	92,7	120,8	28,1	30,3
	" 10-40% del recorr.	7,2	16,5	8,8	122,0
	" 50-80 "	169,4	323,9	154,5	91,2
	" 80-90 "	19,9	0	19,9	-
	" anódica	42,3	87,8	45,5	107,5
		331,5	549,0	217,5	65,6

Nº	Posiciones de las bandas	A.F. de la mezcla	Diferenc.	Porcent.
		Esperado	Hallado	
9	<u>I.R.C. y Paget</u>			
	Banda catódica	27,6	79,3	187,3
	" 10-40% del recorr.	10,5	0	-
	" 50-80 "	45,6	95,2	108,0
	" 80-90 "	0	0	-
	" anódica	289,2	618,5	113,0
		372,9	793,0	112,0
10	<u>Adenoma próstata y Paget</u>			
	Banda catódica	16,1	24,8	54,0
	" 10-40% del recorr.	10,6	6,9	35,0
	" 50-80 "	6,0	5,5	8,0
	" 80-90 "	78,7	58,0	26,3
	" anódica	51,3	41,4	19,3
		162,7	136,6	16,0
11	<u>Neop. gástrica y Paget</u>			
	Banda catódica	106,9	104,3	2,4
	" 10-40% del recorr.	11,0	32,9	199,0
	" 50-80 "	6,0	0	-
	" 80-90 "	229,7	263,5	147,0
	" anódica	73,1	164,7	125,0
		426,7	565,4	32,5
12	<u>Linfoma y Paget</u>			
	Banda catódica	58,4	95,1	62,8
	" 10-40% del recorr.	4,8	0	-
	" 50-80 "	6,0	0	-
	" 80-90 "	92,7	92,8	0,1
	" anódica	63,3	41,8	34,1
		225,2	229,6	2,0
13	<u>Mieloma y Paget</u>			
	Banda catódica	49,3	53,6	8,7
	" 10-40% del recorr.	4,8	0	-
	" 50-80 "	6,0	0	-
	" 80-90 "	60,3	109,2	81,0
	" anódica	73,1	43,3	49,7
		193,5	206,1	6,5

Los resultados obtenidos en mezclas de sueros patológicos confirman los anteriores resultados sobre mezclas. Igualmente se producen anomalías en la posición de las bandas, tales como desplazamientos, desapariciones y formaciones de nuevas bandas en la mezcla. Por otra parte, en las actividades de las bandas lo corriente es que no se cumpla el criterio de aditividad. Desde un punto de vista general, hay un aumento de la actividad fosfatásica en las bandas, excepto en las bandas correspondientes al intervalo 10-40% del recorrido, que en forma global resultan estar disminuidas.

5.3.8. Estudio de mezclas de homogenados de órganos y sueros patológicos

Se completa este estudio de mezclas con la interacción entre homogenados de órganos y sueros patológicos. Se intenta obtener información que confirme los resultados encontrados en las otras mezclas.

La metodología utilizada es análoga, en sus líneas generales, a la empleada en las otras mezclas con la variante de mantener fija la cantidad de homogenado, 0,5 ml, y formar mezclas con cantidades crecientes de suero, 0,1; 0,2; 0,3 y 0,5 ml respectivamente.

El estudio comprende 5 series de ensayos. Los órganos congelados a -20°C se dejaban a la temperatura ambiente hasta su descongelación y seguidamente se preparaban los homogenados. Los sueros procedían de muestras de enfermos hospitalizados; el ensayo de mezclas fué realizado el mismo día que la extracción.

La fosfatasa alcalina de las mezclas en U.I. con indicación del suero patológico y su contenido en F.A. son:

ACTIVIDAD FOSFATASICA DE MEZCLAS DE HOMOGENADOS Y SUEROS

N°	Homogenado	FA	Suero pat.	FA	F.A. de la mezcla		
					Valor esper.	Valor hallado	Porcent.
1	HUESO	82	E. PAGET	524			
	0.5 ml	-	0.1 ml	-	155	110	29.0
	0.5	-	0.2	-	207	164	20.7
	0.5	-	0.3	-	247	230	6.9
	0.5	-	0.5	-	303	172	43.2
2	HIGADO	126	CIRROSIS H	147			
	0.5 ml	-	0.1 ml	-	129	106	17.8
	0.5	-	0.2	-	132	110	16.6
	0.5	-	0.3	-	133	94	29.3
	0.5	-	0.5	-	136	116	14.7
3	RINON	140	I.R.C.	41			
	0.5 ml	-	0.1 ml	-	124	65	47.6
	0.5	-	0.2	-	102	74	27.4
	0.5	-	0.3	-	94	74	21.2
	0.5	-	0.5	-	91	60	34.1
4	INTESTINO	456	CIRROSIS H	147			
	0.5 ml	-	0.1 ml	-	404	375	7.2
	0.5	-	0.2	-	367	366	0
	0.5	-	0.3	-	340	360	5.8
	0.5	-	0.5	-	301	303	0
5	HIGADO	126	E. PAGET	524			
	0.5 ml	-	0.1 ml	-	192	110	42.7
	0.5	-	0.2	-	239	164	31.3
	0.5	-	0.3	-	274	230	16.1
	0.5	-	0.5	-	325	172	47.0
					$\Sigma = 4295$	$\Sigma = 3455$	

De la anterior caústica puede inferirse:

- En las mezclas de homogenados con cantidades crecientes de sueros patológicos, globalmente, se producen pérdidas en la actividad fosfatásica que alcanzan a un 18%.
- Cuando un componente es el homogenado de intestino no se observan pérdidas en FA, contrariamente al resultado general, en el ensayo de la serie se origina un pequeño aumento; puede decirse que la FA se mantiene constante.
- Entre las series, así como dentro de cada serie, las pérdidas de FA se producen en forma errática; no se observa ninguna ley, es decir, la mezcla en distintas proporciones no influye en el fenómeno.

En los geles, la distribución de la actividad fosfatásica, AF, en las bandas en UI convencionales, de las mezclas estudiadas, con indicación de proporciones de la mezcla, posiciones de las bandas en las zonas de interés, en valores esperados y hallados, figura en la tabla siguiente.

Los valores esperados se han obtenido por la fórmula análoga empleada en 5.2.4. teniendo en cuenta la relación de los volúmenes de la mezcla

$$AF \text{ esperado} = \frac{FA \times AF \times V + F'A' \times A''F'' \times V'}{V + V'}$$

FA y F''A'' = Fosfatasa Alcalina en UI del homogenado y del suero respectivamente

AF y A''F'' = Porcentajes de activ. fosf. en los geles, x 0.01 en homog. y sueros

V y V' = Volúmenes de homogenado y suero en la mezcla

ACTIVIDADES FOSFATASICAS DE MEZCLAS EN GELES

N° Posición de las bandas		Actividad fosfatásica, AF, en UI convencionales							
Homogenado-suero		Homogenado-suero 0.5:0.1				Homogenado-suero 0.5:0.2			
		V.Esp°	V.Hall	Difer	%	V.Esp°	V.Hall	Difer.	%
1	<u>Hueso-Paget</u>								
	Banda catódica	17,4	11,0	-6,4	36,8	14,1	19,7	+5,6	39,7
	" 10-40% del recorr.	8,6	14,3	+5,7	66,3	8,8	13,1	+4,3	48,8
	" 50-80 "	-	-	-	-	-	-	-	-
	" 80-90 "	-	-	-	-	-	8,2	+8,2	-
	" anódica	129,7	74,8	-54,9	42,3	180,8	123,0	-57,8	31,9
2	<u>Hígado-Cirrosis Hepática</u>								
	Banda catódica	78,3	20,1	-58,2	74,3	72,9	26,4	-46,5	63,4
	" 10-40% del recorr.	14,9	21,2	+6,3	42,3	15,3	15,4	+0,1	0,6
	" 50-80 "	9,5	6,4	-3,1	32,6	8,1	4,4	-3,7	45,7
	" 80-90 "	1,5	-	-1,5	-	2,5	-	-2,5	-
	" anódica	24,8	58,5	+33,5	135,0	32,6	63,8	+31,2	95,7
3	<u>Riñón-I.R.C.</u>								
	Banda catódica	34,6	20,1	-14,5	41,9	30,4	22,2	-8,2	26,9
	" 10-40% del recorr.	23,3	11,7	-11,6	49,8	20,0	11,1	-8,9	44,5
	" 50-80 "	45,6	25,4	-20,2	44,3	39,1	37,0	-2,1	5,4
	" 80-90 "	-	-	-	-	-	-	-	-
	" anódica	14,3	12,4	-1,9	13,3	12,5	3,7	-8,8	70,4
4	<u>Intestino-Cirrosis Hepática</u>								
	Banda catódica	98,1	153,7	+55,6	56,7	89,9	84,2	-5,7	6,3
	" 10-40% del recorr.	78,9	18,7	-60,2	76,3	70,2	80,5	+10,3	14,7
	" 50-80 "	190,0	45,0	-145,0	76,3	162,8	120,8	-42,0	25,8
	" 80-90 "	3,7	86,3	+82,6	223,2	6,3	73,2	+66,9	1062,0
	" anódica	33,8	71,2	+37,4	110,6	33,5	11,0	-22,5	67,2
5	<u>Hígado Paget</u>								
	Banda catódica	39,0	11,0	-28,0	71,8	37,2	19,7	-17,5	47,0
	" 10-40 % del recorr.	65,8	14,3	-51,5	78,3	57,9	13,1	-44,8	77,3
	" 50-80 "	-	-	-	-	-	-	-	-
	" 80-90 "	-	62,7	62,7	-	-	124,6	124,6	-
	" anódica	87,5	11,0	-76,5	87,4	144,6	6,6	-138,0	95,4

N	Posición de las bandas	Actividad fosfatásica, AF, en UI convencionales								
		HOMOGENADO-SUERO 0,5:0,3				HOMOGENADO-SUERO 0,5:0,5				
	Homogenado-suero	V. Espº	V. Hall.	Difer.	%	V. Espº	V. Hall.	Difer.	%	
<hr/>										
1	<u>Hueso-Paget</u>									
	Banda catódica	19,6	29,9	10,3	52,5	20,9	15,5	-5,4	25,8	
	" 10-40% del recorr.	9,1	13,8	4,7	51,6	9,3	13,7	4,4	47,3	
	50-80 "	-	-	-	-	-	-	-	-	
	" 80-90 "	-	-	-	-	-	-	-	-	
	" anódica	219,0	186,3	-32,7	14,9	272,8	142,8	-130,0	47,6	
2	<u>Hígado-Cirrosis Hepática</u>									
	Banda catódica	68,9	19,7	-49,2	71,4	63,4	30,2	-33,2	52,4	
	" 10-40% del recorr.	15,6	6,6	-9,0	57,7	16,0	9,3	-6,7	41,9	
	" 50-80% del "	7,1	3,8	-3,3	46,5	5,7	8,1	2,4	42,1	
	" 80-90% "	3,3	-	-3,3	-	4,4	-	-4,4	-	
	" anódica,	38,4	63,9	25,5	66,4	46,6	67,3	20,7	44,4	
3	<u>Riñón-I.C.R.</u>									
	Banda catódica	27,2	18,5	-8,7	31,9	22,8	16,8	-6,0	26,3	
	" 10-40% del recorr.	17,5	9,6	-7,9	45,1	14,0	6,0	-8,0	57,1	
	" 50-80 "	34,3	11,8	-22,5	65,6	27,5	35,4	7,9	28,7	
	" 80-90 "	-	-	-	-	-	-	-	-	
	" anódica	11,2	6,7	-4,5	40,2	9,3	1,8	-7,5	80,6	

N Posición de las bandas Actividad fosfatásica, AF, en UI convencionales
HOMOGENADO-SUERO 0,5:0,3 HOMOGENADO-SUERO 0,5:0,5
Homogenado-suero V. Espº V. Hall. Difer. % V. Espº V. Hall Difer. %

4 Intestino-Cirrosis Hepática

Banda catódica	83,8	108,0	24,2	28,9	75,3	96,9	21,6	28,7
" 10-40 % del recor	63,6	18,5	-45,1	70,9	54,4	45,4	-9,0	16,5
" 50-80 % "	142,5	46,8	-95,7	67,1	114,0	3,0	-111,0	97,4
" 80-90 % "	8,3	82,8	74,5	897,6	11,0	72,7	61,7	560,9
" anódica	41,9	97,2	55,3	132	46,8	84,8	38	81,2

5 Hígado-Paget

Banda catódica	35,8	29,9	-5,9	16,5	33,9	15,5	-18,4	54,3
" 10-40 % del recor	51,5	13,5	-38,1	73,4	43,7	13,7	-30,0	68,6
" 50-80 % "	-	-	-	-	-	-	-	-
" 80-90 % "	-	-	-	-	-	-	-	-
" anódica	187,5	186,3	-1,2	0,12	47,4	142,8	-104,6	42,3

Los valores hallados se han obtenido como en las anteriores mezclas

A F hallado = F A de la mezcla x Porcentaje de la A F en gel de la mezcla x 0,01.

La suma de todos los ensayos en los intervalos considerados en cada proporción de la mezcla así como la suma general de las AF esperadas y halladas, se muestra a continuación:

Posiciones de las bandas Esperado [hallado diferencia porcentaje

mezcla 0,5 + 0,1

Banda catódica	267,4	215,9	-51,5	19,2
" 10-40 % del recorrido	191,5	80,1	-111,4	58,2
" 50-80 "	245,1	76,8	-168,3	68,6
" 80-90 "	5,2	149,0	143,8	-
" anódica	290,1	227,9	-62,2	21,4

mezcla 0,5 + 0,2

Banda catódica	244,5	172,2	-72,3	29,6
" 10-40 % recorrido	172,2	133,2	-39,0	22,6
" 50-80 % "	210,0	162,2	-47,8	22,8
" 80-90 % "	8,8	206,0	197,2	-
" anódica	404,0	208,1	-195,9	48,5

mezcla 0,5 + 0,3

Banda catódica	235,3	206,0	-47,3	20,1
" 10-40 % del recorrido	157,3	62,0	-95,3	60,6
" 50-80 "	183,9	62,4	-121,5	66,1
" 80-90 "	11,6	82,8	71,2	-
" anódica	498,0	540,4	42,4	8,5

mezcla 0,5 + 0,5

Banda catódica	216,3	174,9	-41,4	19,1
----------------	-------	-------	-------	------

Banda 10-40 % del recorrido	137,4	88,1	-49,3	35,9
" 50-80 "	147,2	46,5	-100,7	68,4
" 80-90 "	15,4	72,7	57,3	-
" anódica	622,9	439,5	-183,4	29,4

Todas las mezclas

Banda catódica	963,5	769,0	-194,5	20,2
" 10-40 % del recorrido	658,4	363,4	-295,0	44,8
" 50-80 "	786,2	347,9	-438,3	55,7
" 80-90 % "	41,0	510,5	468,5	-
" anódica	1815,0	1415,9	-399,1	22,0

General todas las mezclas

y bandas	4264,1	3406,7	-857,4	20,1
----------	--------	--------	--------	------

Las posiciones de las bandas de las mezclas en el gel figuran en el anexo n° del apéndice. Como en anteriores mezclas, se producen apariciones de nuevas bandas que no se encuentran en los componentes así como desdoblamientos y desplazamientos. En muchos casos, en los geles de la mezcla, las bandas se mantienen en los lugares esperados.

Respecto a la actividad fosfatásica de las bandas los resultados obtenidos, en homogenados de tejidos con mezclas de sueros patológicos, son análogos a los encontrados en las otras mezclas. En resumen:

- Los valores hallados de las actividades fosfatásicas son inferiores a los esperados por cálculo de los componentes de la mezcla.
- Esta pérdida de actividad es mayor en las bandas intermedias excepto en la zona del 80-90 % del recorrido de la banda anódica en la que se produce un aumento. Esta

anomalía se la puede considerar debida a un desdoblamiento de la banda anódica en la que están solapadas varias isoenzimas.

- Por variación de la proporción entre el homogenado y el suero patológico no se observa ninguna tendencia de tipo global.
- Individualmente en cada ensayo, se producen disminuciones y aumentos de la actividad en las bandas, situados, en los intervalos estudiados del gel, en forma errática.

5.4. ENSAYOS SOBRE INHIBICIONES

Aun cuando se han podido identificar las bandas correspondientes a la mayoría de las fracciones o isoenzimas de la fosfatasa alcalina, con bastante garantía, mediante comparaciones en la posición y AF de las bandas del espectro electroforético entre los distintos modelos obtenidos con suero de enfermos, homogenados de órganos y sus mezclas, se ha efectuado un breve estudio, con algunos de los inhibidores que corrientemente utilizan los investigadores para la fosfatasa alcalina, con el propósito de confirmar los resultados obtenidos en los apartados anteriores así como los encontrados en la literatura.

Este estudio sobre inhibiciones es incompleto, es un trabajo previo de carácter cualitativo, que tiene únicamente el propósito de obtener alguna información que pueda servir de base para futuros estudios con la técnica ensayada.

Se han ensayado los siguientes inhibidores:

- L-fenilalanina. (Sigma, No. P-2126). Solución 5 mM/l
- Urea. (Riedel). Soluciones 0.5;1.0;2.0;3.0;5.0 y 7.0 M/l
- EDTA. (Titriplex III. Merck). Solución 10 mM/l
- Temperatura: 56°C a 15 y 30 minutos; 60°C, 10 minutos
- Neuroaminidasa. (Sigma. Actividad: 0.018 U/mg de proteína, con ácido N-Acetilneuroamínico). Preparación:
 - Buffer: 14 ml de ácido acético glacial + 86 ml. de solución de acetato (8.2 g de acetato sódico y 8.7 ml de ácido acético glacial, en un volumen de 100 ml con agua destilada) + 878.5 mg de ClNa + 95 mg de $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.
 - Reactivo de neuroaminidasa: A 1 ml de buffer se adiciona 2 mg de neuroaminidasa sustancia. Preparado en el día.

METODICA

Las inhibiciones se han realizado directamente en el gel, mediante una solución con el inhibidor que se difundía a su través y alcanzaba las fracciones fosfatásicas separadas electroforéticamente.

Este proceder no se ha encontrado descrito, en la literatura consultada, para estudios de inhibiciones en electroforesis de disco. Los resultados obtenidos se consideran como muy prometedores, proporcionando bandas muy marcadas y nítidas, de fácil comparación entre geles con y sin inhibidores. En principio, esta técnica, parece ser ventajosa por efectuar la inhibición en la propia isoenzima y posibilidad de fácil interpretación.

En algunos casos, generalmente en homogenados, la inhibición se ha realizado directamente en el suero u homogenado. La inhibición con neuraminidasa se ha efectuado únicamente por este último procedimiento debido a que la difusión de esta enzima a través del gel tendría grandes dificultades con resultados dudosos.

La fosfatasa alcalina total, tanto del suero como de los homogenados y mezclas, se determinó por el método general, en la misma tanda que en los ensayos con inhibidores. En la determinación de la FA total, cuando intervienen inhibidores, estos se incorporan en el buffer, o sea, la composición final es

0.09 ml de suero (homogenado o mezcla)
0.90 ml de buffer con el inhibidor
0.90 ml de solución con el sustrato
1.20 ml de agua

La determinación de la FA total del suero, etc., con y sin inhibidor tiene el mismo volumen final, así como cantidad de

muestra y sustrato; el inhibidor se encuentra diluído en 0.9/3.09 = 0.29 con respecto a la concentración en el buffer y a la ejercida en el gel por el inhibidor.

Otro procedimiento empleado en la determinación de la FA total y que en los protocolos aparece con la indicación de "En hom.", usado en homogenados y mezclas cuando intervienen inhibidores, consiste en preparar una mezcla constituida por

- 0.25 ml del homogenado o mezclas
- 0.25 ml de solución del inhibidor (4 veces más concentrada)
- 0.50 ml de buffer carb-bicarb. pH 7

de la anterior mezcla se toma 0.09 ml y se determina la FA por el procedimiento general y el resultado obtenido se multiplica por 4.

Los geles fueron preparados siguiendo el procedimiento general cuando la inhibición se efectúa en el gel, mientras que si se realiza en la muestra directamente, la preparación del gel se hace tomando, asimismo, 25 microlitros de la mezcla para el homogenado.

La inhibición con neuroaminasa se ha efectuado mezclando volúmenes iguales del reactivo de neuroaminasa y el suero u homogenado durante dos horas a 37°C en baño de agua. De la misma muestra se determina la FA y las fracciones enzimáticas.

Las inhibiciones en los geles se han efectuado llenando el tubo que contiene el gel con la solución del inhibidor y una incubación de 2 horas a 37°C; después de un lavado se procede al desarrollo del color de las bandas mediante una nueva incubación con el sustrato. En la inhibición por el calor, el tratamiento se efectúa en el mismo tubo del gel lleno de agua y en un baño a la tempe-

a la temperatura y tiempo ensayados.

En procedimiento directo, sobre el suero u homogenado, la concentración del inhibidor es tal para que en la solución final tenga la concentración deseada.

Cuando la inhibición se efectúa sobre el gel, el inhibidor se incorpora a la solución de A M P en la concentración experimentada, por tanto, la solución final no tiene la concentración equivalente al procedimiento anterior debido a razones experimentales.

RESULTADOS

Los resultados de cada ensayo, con inclusión de todos los inhibidores empleados en homogenados, sueros y mezclas, obran en los anexos números del apéndice.

Para una visión general del efecto de cada inhibidor se reagrupan los resultados de los ensayos en hojas individuales las cuales figuran a continuación.

L- fenilalanina

De los resultados se desprende que:

- En bandas anchas anódicas, con o sin hombros, al ser incubado el gel con el inhibidor, en casi la totalidad de los casos se produce un desdoblamiento de la banda acompañada de un desplazamiento de los picos en la densitometría al dejar de solaparse las bandas componentes.
- Con cierta frecuencia, en la zona del 50-80 %, ban-

- das existentes en el gel deaparecen, mientras que en otros casos aparecen nuevas bandas en esa zona.
- Apenas se producen alteraciones, ni en la posición ni en la intensidad, de las bandas situadas entre el 10-50 % del gel.
- La banda catódica siempre aparece estimulada su actividad porcentualmente.
- Los homogenados de órganos ofrecen mayor resistencia al tratamiento con el inhibidor con excepción del riñón que aparece como más vulnerable.

Urea

A las distintas concentraciones, las acciones de la urea puede resumirse en:

A bajas concentraciones, la urea ejerce una acción activadora sobre la enzima. La F A total generalmente está aumentada. Por el contrario, la urea a concentraciones altas actúa como inhibidor, llegando a la casi anulación de la actividad catalítica.

Urea 1M: En gel

- La banda considerada como osea, situada en la zona 80-90 % del gel, queda muy inhibida, con ello, se hace más ostensible la banda anódica.
- Con cierta frecuencia, en el tratamiento con urea 1 M, aparecen bandas en la zona 50-80 % no presentes en el gel sin tratamiento.

- En la zona del 10-40 % se observa generalmente una estimulación en la actividad.

Urea 2 M:

- El tratamiento a esta concentración ha sido utilizada generalmente en homogenados.
- Se observa, en general, gran analogía entre los espectros de los geles tratados y sin tratar. Las pequeñas tendencias son: Inactividades en la zona 80-90 % y en la banda anódica, Aumento porcentual en la banda catódica y muy pequeña variación en las bandas intermedias.

Urea 3 M: En gel. La tendencia general es:

- En la zona 80-90 %, la inactivación es elevada, llegando a la desaparición de las bandas.
- En las intermedias, 50-80 %, se hacen presentes bandas en menor cuantía que en el tratamiento con urea 1 M. En la zona 10-40 %, el comportamiento es semejante a la urea 1 M.
- Las bandas catódicas aparecen estimuladas y las anódicas inactivadas.

Urea 5 M: En gel. Se advierte:

- Generalmente desaparecen las bandas intermedias.
- Cuando la fosfatasa alcalina total es muy alta en el suero, la inactivación en el gel, en todas las bandas, no es muy marcada.

Urea 7 M:

- En los geles la inactividad es total en todas las bandas.

Como resumen puede decirse que la inactivación por urea es más resistente en los homogenados de tejidos que en los sueros. En los homogenados, resultan como menos resistentes los de hueso y riñón.

Temperatura

56° 15 min.

- En la zona del gel del 80-90 %, se produce una inactividad muy marcada.
- Cuando existen bandas en el intervalo del gel del 50-80 %, a la temperatura y tiempo indicadas, las bandas se presentan como resistentes.
- En la región del 10-40 % la inactivación es alta así como en las bandas catódicas.
- Las bandas anódicas muestran alguna resistencia a la inactivación, aún cuando las bandas quedan muy disminuídas.

56° 30 min.

- La inactivación, en estas condiciones, es muy alta en todo el gel.

Las neoplasias se apartan de los resultados anteriormente descritos y se confirma lo señalado en la literatura. A Veces, en la posición del 80-90 %, persisten algunas bandas después del calentamiento, así como en las zonas del 50-80 % y 10-40 %.

60°10 min.

- La inactivación es casi total, queda únicamente vestigios en la banda anódica.

EDTA

Con este agente secuestrante la inactivación es general, la desaparición de las bandas es total.

Neuroaminidasa

Se confirma lo indicado en la literatura, esto es, la persistencia de las bandas asentadas en la zona del 50-80 %, correspondientes a isoenzimas intestinales. El resto de las bandas, alteradas por la acción de la neuroaminidasa, pierden movilidad y se colocan en el primer tercio del gel.

INHIBICIONES CON L-FENILALANINA 5 mM

- 236

Identificación	Inhibic.	F.A.	Posición pct. de las bandas en gel y A											
			0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	Obse
SP44 Neumonía		51	2	26							6	23	33	
	En gel	61	20	3							16	20	40	
SP45 Ict Obst		150	29	6				11					54	
	En gel	170	38	7							14	11	14	
SP46 Ict. Obst		480	32	6							9	27	19	
	En gel	542	31	10							18		41	
SP47 Epilep		50	2	3							18		77	
	En gel	60	1		3	3							93	
SP 48 Epilep		91	2										98	
	En gel	93	3	1								66	30	
SP49 Epilep		80	2										98	
	En gel	85	11	4								50	35	
SP50 Epilep		96	5						4				81	
	En gel	104	5						2	4	5	48	37	
SP51		103	3									59	38	
	En gel	120	9									14	77	
SP52 Epilep		104	3									7	90	
	En gel	115	3									9	88	
SP53 Epilep		86	7										93	
	En gel	96	13						2	11	38	36		
SP54 Epilep		114	5							3	53	39		
	En gel	120	8							18		64		
SP55 Epilep		152	2										98	
	En gel	172	3						4		5	88		
SP56 Epilep		135	1							3			96	
	En gel	145	1								43	27	29	
SP57 Epilep		27	4										96	
	En gel	30	4										96	
SP58 Epilep		89	2										98	
	En gel	99	2										98	
SP59 Epilep		91	5									62	33	
	En gel	95	10									70	20	
SP60 Epilep		106	2										98	
	En gel	126	2									88	9	
SP 61 Epilep		191	2									69	29	
	En gel	201	2									73	25	
SP62 Linfoma		116	15									14	71	
	En gel	126	43					3	1	2		21	30	

INHIBICIONES CON L-FENILALANINA 5 mM

ntificación	Inhibic.	F.A.	Posición pct. de las bandas en gel y AF %										Obser.	
			0	10	20	30	40	50	60	70	80	90		100
Intest. 4B		202 19				15				48			18	
	En hom	240 63				7					4	16	10	
Intest, 5B		437 34			25					28	8			6
	En hom	508 43			21					20	11			6
Intest. 7B		294 24						12						65
	En gel	145 35				35								31
Hígado 2N		638 28			25					32				16
	En hom	524 34				19				24				18
Hígado 7B		16 80						15				3		2
	En hom	18 77						10				8		7
Hígado 8N		159 29								21				50
	En gel	220 28						15		34				29
Piñón 3N		94 61						28				6		5
	En hom	124 77						23						0
Piñón 7N		63 64										6		30
	En gel	63 20								29				51
Hueso 6N		141 25										42		34
	En gel	160 31						11	20			26		12
Hígado 2N		565 28				25						32		16
		47 12							4				42	42
cla h+s(1:1)		287 11			22		6				15			47
	En mezcla	153 29					23					20		21

INHIBICIONES CON UREA

- 238 -

Identificación	Inhibic.	F.A.Posición pct. de las bandas en gel y A												Obser
		0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100		
SN1		27	5							5		90		
	1 M gel	22	6			8	8			8		70		
	3 M	10	11						7		7	76		
	5 M	5	3									97		
SN2		42	8							11	21	2435		
	1 M gel	39	5						18		13	64		
SN3		29	6							35	20	65		
	1 M gel	21	0							33		67		
	3 M	9	0					15				85		
	5 M	5	0									100		
SN4		26	8	1					5		25	61		
	1 M gel	22	11	3					5	34		50		
	3 M	6	9							34		58		
	5 M	4	0								17	83		
SP1 Cirrosis		51	10							10		25	25	
	1 M gel	69	8						7		15	70		
SP2 Paget		41	3								26	44	27	
	1 M gel	15	2								1	39	59	
SP3 Paget		268	6			2	2				12	27	50	
	1 M gel	164	8					7				45	40	
SP4 Cirr H		50	5									39	56	
	1 M gel	64	2									44	54	
SP6 Ca. fast.		300	9								25	31	32	
	1 M gel	304	0								20		80	
SP7 Adenoma.		33	5									32	63	
	1 M gel	14	23							19			61	
	3 M	10	13								32		55	
	5 M	5	0										100	
SP15 Adenoma.		460	6								47		47	
	1 M gel	422	16	16					4	5	11	12	36	
	3 M	238	16		14				4	4	16	22	23	
	5 M	100	13		12								75	
SP23 Icteric.		105	39								5	25	31	
	1 M gel	100	47							4		30	19	
	3 M	40	65									17	18	
	5 M	25	100							0	0		0	
	7 M	22	100							0	0		0	

- 239 -

[illegible]

INHIBICIONES CON UREA

- 240 -

Nº Identificación Inhibic. F.A. Posición pct. de las bandas en ge
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

26 Hom. 2N Hígado	638 28	25					32	16		
0,5 M Ho	678 50	21					16	13		
2M	498 59	17					14	10		
27 Hom. 7B Hígado	16 80	15					3	2		
0,5 M Ho	18 69	21					4	6		
2M	12 62	33					6	0		
28 Hom. 8N Hígado	159 29						21	50		
1M gel	190 17	11					38	34		
3M	90 29	9					32	30		
5M	65 28	6					36	31		
7M	57 100	0					0	0		
29 Hom. 3N Riñón	94 61					28		6	5	
0,5M Ho	100 52					32		8	8	
2M	75 73					19		8	0	
30 Hom 7N Riñón	63 64							6	30	
1M gel	52 37	21						28	14	
3M	30 84	9					2	5		
5M	18 100	0					0	0		
7M	13 100	0					0	0		
31 Hom. 6N Hueso	141 25						42	34		
1M gel	66 17	17	35				19	12		
3M	50 22		12	31	20			14		
5M	48 20			54		15		11		
7M	0 0			0		0		0		
32 Hom 2N Hígado	565,28	25					32	16		
S.N.	47 12						4	84		
Mezcla H+S(1:1)	287 11	22	6				15	47		
En mezcla 0,5 M	164 41	14	9				17	19		
En mezcla 2M	65 58	17					11	15		

Nº	Identific.	Temp.	Min	F.A.	Posición pct. de las bandas en gel y AF %																Observ.
					0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100						
16	S.P.-19			24	14	2										84	En gel				
	(cirrosis) 60°C	10	4	1												99					
17	S.P.-20			33	8	2					20	30				40	En gel				
	(cirrosis) 60°C	10	3	8												92					
18	S.P.-21			20	31	6		3								25 35	En gel				
	(cirrosis) 60°C	10	8	10												90					
19	S.P.-22			24	7	1		1								91	En gel				
	(cirrosis) 60°C	10	4	3												97					
20	S.P.-23			105	39								5	25	31	En gel					
	(Ictericia) 56°C	15	15	19												81					
		30	10	0												0					
21	S.P.-24			236	16	8										56 20	En gel				
	(Ictericia) 56°C	15	26	25												75					
		30	22	0												100					
22	S.P.-27			480	32	6		7				9	27	19	En gel						
	(Ictericia) 56°C	15	48	40	5					9			16	30							
		30	35	49			4				11					36					
23	S.P.-29			52	9	1				2						88	En gel				
	(cirrosis) 60°C	10	1	6												94					
24	S.P.-30			123	30		10				5	5				50	En gel				
	(Ict. Obst) 60°C	10	20	40												60					
25	S.P.-31			65	19	2										79	En gel				
	(Hepatop.) 60°C	10	5	5												95					
26	S.P.-32			39	0		9		6	5			15	42	En gel						
	(cirrosis) 60°C	10	1	10												90					
27	S.P.-33			111	28	10	10	10			5	11	6	20	En gel						
	(Hepatop.) 60°C	10	15	35	2					1						62					
28	S.P.-35			200	9											51 40	En gel				
	(Paget) 56°C	30	10	15												39 46					
29	S.P.-36			1520	7	2					3		43	45	En gel						
	(Paget) 56°C			150	9								48	43							
30	S.P.-38			52	12								18	70	En gel						
	(Pancreat.) 56°C	30	10	22												78					
31	S.P.-39			113	12											88	En gel				
	(cirrosis) 56°C	30	10	10												90					
32	S.P.-40			50	20								27	53	En gel						
	(Tub. pulm) 56°C	30	10	21												79					

ESTABILIDAD A LA TEMPERATURA

° Identific.		Temp.	Min.	F.A.	Posición pct. de las bandas en gel y AF%										Observ.	
					0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
3	S.P.-41				81		5						4	60	32	En gel
	(Tub. pulm.)	56°C	30		8		8								92	
34	S.P.-42				56		22						5	29	44	En gel
	(Insf, resp)	56°C	30		10		2					2			96	
35	S.P.-43				30		20					5			75	En gel
	(Pielonef)	56°C	30		6		0	70							30	
36	S.P.-47				50		2	3						18	77	En gel
	(Epilep)	56°C	30		5		3								97	
37	S.P.-48				91		2								98	En gel
	(Epilep)	56°C	30		15		2								98	
38	S.P.-62				116		15							14	71	En gel
	(Linfoma)	56°C			20		22								78	
39	H. Intest				202		19			15			48		18	En hom.
	(4B) H-1	56°C	15		0		9								0	
40	H. Intest				437		34		25				28	8	6	En hom.
	(5B) H-2	56°C	15		29		100								0	
			30		26		0								0	
41	H. Intest				294		24			12					65	En gel
	(7B) H-3	56°C	15		9		26			22					53	
			30		8		44			18					38	
2	H. Hígado				159		29						21		50	En gel
	(8N) H-6	56°C	15		3		36						24		41	
			30		7		50						15		35	
3	H. Hígado				16		80			15			3		2	En hom.
	(7B) H-5	56°C	15		3		0								0	
			30		0		0								0	
4	H. Riñón				94		61			28				6	5	En hom.
	(3N) H-7	56°C	15		3		100								0	
			30		0		0								0	
5	H. Riñón				63		64						6		30	En gel
	(7N) H-8	56°C	15		6		64								36	
			30		6		63								37	
7	H. Placenta				732		32	21	30				29		9	En hom.
	(3B) H-9	56°C	15		493		29	1	14				44		12	
			30		494		22	4		19	24				12	

ESTABILIDAD A LA TEMPERATURA

Nº Identific.	Temp.	Min.	F.A.	Posición pct. de las bandas en gel y AF											Observ.
				0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
47 H. Placenta			452	13		8	12			26		10	31		En gel
(6B) H-10	56°C	15	485	16		10				8		28	39		
		30	485	16		13				19		19	34		
48 H. Hueso			141	25								42	34		En gel
(6N) H-11	56°C	15	7	37				26		14			23		
		30	7	55						7		11	27		
49 H. Hueso 4N			113	5			10						85		En gel
Suero Paget			524	5			2						93		
Mezcla h+s			222	10		1						45	44		
H. Hueso	56°C	30	79	0									0		
Suero Paget	56°C	30	25	1	1	1						13	83		
Mezcla h+s	56°C	30	56	52		48							0		

Nota: Los ensayos de estabilidad a la temperatura correspondientes a me
clas de homogenados de órganos en el anexo nº del apéndice.

INHIBICIONES CON EDTA

Identificación	Inhibic.	F.A.	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	Observ.
SN3		29	6							5	20		69	
	10 mM	0	0							0	0		0	
SP23 Ictericia		105	39								5	25	31	
	10 mM	10	0										100	
SP24 Ictericia		236	16	8								56	20	
	10 mM	30	55	10								8	27	
SP46 Ictericia		480	32	6			7				9	27	19	
	10 mM	30	100	0			0				0	0	0	
Hom. Intestino 4B		202	19				15				48		18	
	10 mM H	0	100				0				0		0	
Hom. Intestino 5B		437	34			25				28		8	6	
	10 mM H	74	100			0				0		0	0	
Hom. Intestino 7B		294	24					12					65	
	10 mM H	43	100					0					0	
Hom. Hígado 7B		16	80				15					3	2	
	10 mM H	4	100				0					0	0	
Hom. Riñón 3N		94	61					28				6	5	
	10 mM H	4	100					0				0	0	
Hom. Hueso 6N		141	25							42			34	
	10 mM	70	100							0			0	

INHIBICIONES CON NEUROAMINIDASA

- 246 -

Nº Identificación Inhibic. F.A. Posición pct. de las bandas en gel y
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 Obse

1	SN1	27	5					5		90	
	En sue.	66	5				87	8		0	
2	S.N.-2	42	8					11	21	24	35
	En sue.	84	5		25	54		14	0	0	0
3	S.N.-3	29	6					5	20	69	
	En sue.	58	8	91				3	0	0	
4	S.N.-4	26	8	1			5			25	61
	En sue.	52	7		55				38	0	
5	SP.1 Cirr. Hep.	51	10					10		25	55
	En sue.	102	20	24	46			10		0	0
6	SP. Paget	268	6		2	2			12	27	50
	En sue.	362	20	21	25	34	0		0	0	0
7	SP.4 Cirr. Hep,	50	5							39	56
	En sue.	120	10	15	44	31				0	0
8	SP.7 Adenoma	33	5							32	63
	En sue.	70	100							0	0
9	SP.15 Ca. Pró.	460	6						47	47	
	En sue.	842	4	4		46	46		0	0	
10	SP. 23 Icter.O.	105	39						5	25	31
	En sue.	144	42	58					0	0	0
11	SP. 24 Ict. Obs.	236	16	8						56	20
	En sue.	334	44	56						0	0
12	Hom. Intestino	294	24			12					65
	En hom.	240	25						30		45
13	Hom. Hígado.	159	29						21		50
	En hom.	106	34			66			0		0
14	Hom. Riñón 3N	94	61				28			6	5
	En hom.	94	55			45				0	0
15	Hom. Hueso 6N	63	64						6		30
	En hom.	38	100						0		0
16	Hom. Hueso. 6N	141	25					42			34
	En hom.	174	36	57	7			0			0

VI. Discusión general

6. DISCUSION GENERAL

6.1. ELECCION DE METODICA

En la revisión de métodos de separación de isoenzimas de la fosfatasa alcalina, en el capítulo 2, quedó de manifiesto que la electroforesis en gel de acrilamida era uno de los procedimientos en el que se observan gran número de bandas.

El gel de acrilamida, por otra parte, es susceptible de una buen lectura densitométrica y por tanto la posibilidad de efectuar estudios cuantitativos; lo anterior unido a que el procedimiento se presta a modificaciones estructurales, como porosidades y a otras condiciones experimentales, le hacen ser un método muy ventajoso para la realización de estudios de separaciones de fracciones porteicas. Además, en la literatura de los últimos años existen muchas publicaciones con esta técnica, indicación de su gran aceptación por los investigadores.

Los primeros ensayos en este trabajo se hicieron con la técnica de Dingjon (1973) basada en los trabajos de Davis y Smith (1968). El gel tiene un solo poro, de 7%, y la electroforesis dura una hora. Con esta técnica las bandas aparecían difuminadas, arrastrando colas y en general es poco discriminativa.

Otra técnica ensayada ha sido el kit comercial de "Carnalco", la cual no indica la composición del gel y reactivos. Tiene dos poros y el tiempo de la electroforesis es asimismo de una hora. La separación de bandas es aceptable. El desconocimiento de la composición de los elementos de esta técnica unido a su alto precio y rigidez de la metodología hizo que se intentaran otros procedimientos.

El estudio para obtener una metodología satisfactoria, em

pezó con geles de un solo poro. Fueron ensayadas porosidades de 6, 7,7 y 8,5 %, manteniéndose constante el buffer y la dilución. En los geles así preparados aparecen únicamente dos bandas, una inmóvil en el cátodo y otra en la zona anódica.

En geles constituidos con dos porosidades, fueron experimentadas las siguientes combinaciones de poros: (A) 2.5 y 7; (B) 2.5 y 5; (C) 2.5 y 9; (D) 5 y 7; (E) 4 y 7.7 % donde las porosidades bajas corresponden a la zona catódica. En los geles A, B y C aparecían un total de cuatro bandas y en los dos últimos geles D y E sólo había presente una banda intermedia.

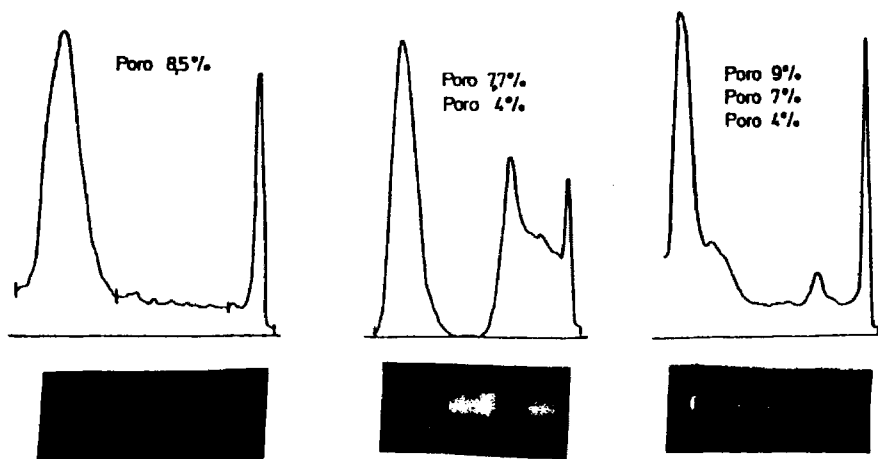
En las experiencias con tres porosidades, la parte catódica del gel es la de poro más bajo, inferior al 5 %, en la parte anódica las porosidades estaban comprendidas entre 8 y 9 %, y en la zona intermedia del gel los poros han oscilado entre 5 y 8%. Se hicieron 11 combinaciones con estas porosidades, obteniéndose con el gel constituido con los poros de 4, 7 y 9 % los mejores resultados considerando las bandas mediante examen visual y gráfica densitométrica.

En esas experiencias se observó que los geles cuya porosidad es inferior al 5 %, preparados con la cantidad de bis-acrilamida indicada por Maurer (1971) mostraban una opalinidad que impedía una lectura densitométrica correcta. Este inconveniente fue salvado disminuyendo la cantidad de bis-acrilamida a una cuarta parte. Con esta modificación queda sin definir el grado de poro de acuerdo con el procedimiento general de preparación de los mismos. Se puede estimar, por la consistencia del gel, que la porosidad es de alrededor de 4 %.

Con la porosidad del 9 % se consigue que la banda anódica resulte bien definida y que la cola, producida con otros poros, quede resuelta en bandas.

Para que todos los ensayos de geles pudieran ser comparables, tanto con una, dos y tres porosidades, se utilizó el mismo "pool" de sueros, que llegó a proporcionar espectros con cinco bandas, netamente separadas, aún cuando en la densitometría algunas aparecen como hombros del pico de mayor área.

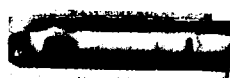
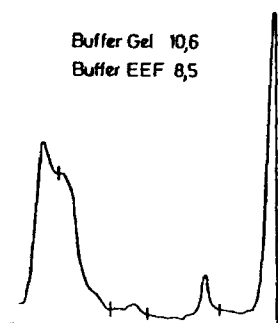
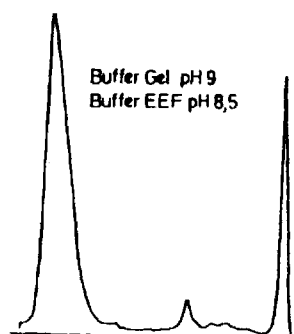
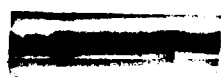
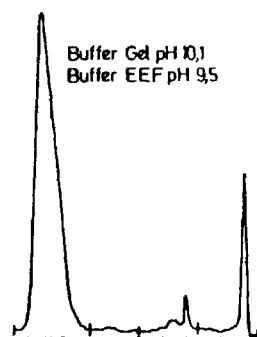
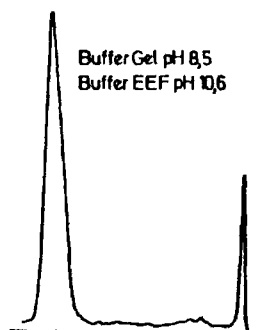
A continuación se muestran fotografías de los geles y gráficos correspondientes:



Obtenidas las mejores características del gel, con las porosidades 4, 7 y 9 %, se buscan las condiciones óptimas de pH de los bufferes del gel y de la electroforesis siguiendo las orientaciones de los trabajos de Wilkinson (1971), Compton (1974) y Skillen (1973) que tienen en cuenta el pH donde la actividad fosfatásica es máxima de cada isoenzima en particular.

Los bufferes son del tipo TRIS-Acido bórico. El buffer del gel, además, contiene TEMED. Los pH ensayados se obtienen por variación de la cantidad de ácido bórico. Se experimentan bufferes que comprenden la zona 8,5 al 10,6 de pH. Los ensayos fueron

realizados por duplicado. Los mejores resultados fueron obtenidos con un buffer de 10.6 para el gel y 8.5, de pH, para el electrolito de la electroforesis. Con el mismo "pool" de sueros antes mencionado se obtuvieron bandas muy nítidas y definidas. Se ha observado que el buffer de la electroforesis tiene gran importancia para la resolución de bandas. Las fuerzas iónicas, calculadas mediante $\mu = 1/2 \sum z^2 c$ son de y respectivamente para los buffers del gel y electrolito.



Para alcanzar el máximo de separación de bandas se corta la electroforesis cuando la banda de albúmina, coloreada con bromofenol, desaparecía del gel, ello quizá represente la pérdida de un punto de referencia y posibilidad de aplicar la técnica del Rf para situar bandas, pero en este compromiso entre aumentar la separación de las bandas en el gel y la referencia de la albúmina, se ha preferido lo primero.

El tiempo de la electroforesis oscila entre 25 y 30 minutos, tiempo muy inferior a otras técnicas, y como se ha dicho anteriormente, se corta la electroforesis cuando la banda de albúmina sale del gel, circunstancia que ocurre casi simultáneamente en todos los geles.

En resumen, el método de separación de fracciones fosfatásicas adoptado en este trabajo presenta unas características generales aceptables, como son:

- Alta resolución de bandas.
- Pequeño tiempo en la electroforesis
- Reproducibilidad en la posición de las bandas y en las áreas de los picos correspondientes a las bandas (Apartados 4.3.8., 4.3.8.1., 4.3.8.2. y 4.3.9.)
- Resolución de las bandas anódicas en formas bien definidas o constituyendo hombros de pico principal en la lectura densitométrica.
- Estabilidad de las bandas en el gel que permite efectuar lecturas densitométricas después de varios meses.

En todos los ensayos efectuados en este estudio ha sido determinado el valor de la actividad de la fosfatasa alcalina total y para conocer su fiabilidad se ha examinado la precisión del método que se emplea en la rutina del laboratorio. En el apartado 4.2.1. se muestran los resultados obtenidos. Los coeficientes de

variabilidad hallados son bajos, que aseguran resultados de confianza y que permiten efectuar comparaciones objetivas así como diferencias entre ensayos, con posibilidad de distinguir los resultados derivados de la variabilidad de la metódica, aspecto esencial en estudios cuantitativos.

Se ha comprobado que las muestras de suero u homogenizados almacenadas a 4°C, en nevera, aumentan lenta y progresivamente su actividad catalítica total, así como al efectuar diluciones. Esta variación de actividad con el tiempo, se ha observado así mismo que no es igual para todas las fracciones fosfatásicas. En el apartado 4.3.9. figuran una serie de ensayos en distintos días donde las fracciones fosfatásicas intermedias en el gel van disminuyendo de actividad, llegando a desaparecer cuando son de pequeña intensidad. Para minimizar este efecto es aconsejable realizar los ensayos en un período no superior a 24 horas en sueros y mantener congelado a -20°C los órganos. En todos los estudios de mezclas o cuando era necesario almacenar alguna muestra, se ha determinado la F.A. actual, en el momento del ensayo.

Un problema surgido en este trabajo fue que los geles no eran exactamente iguales en longitud, debido a las pequeñas variaciones en la medida de volúmenes en la preparación de los geles, así como a la variabilidad de los diámetros de los tubos de vidrio, todo esto unido a la dificultad experimental de cortar la electroforesis una vez que la albúmina desaparecía en los 12 tubos del equipo. El resultado final es una variabilidad entre las distancias de las bandas extremas en el gel. Se ha solucionado este problema normalizando dichas distancias, en forma porcentual del recorrido de la banda anódica. Esta forma de descripción es la que figura en los protocolos. La posición de las bandas están sujetas a una variabilidad que se puede considerar aceptable teniendo en cuenta el número relativamente elevado de casos de este trabajo.

En esta memoria no se ha tenido en cuenta las embarazadas, las cuales, a partir del tercer mes su suero contiene la isoenzima placentaria que con esta técnica es la de mayor movilidad electroforética, lo cual complicaría el sistema posicional de las bandas.

6.2. MODELOS ELECTROFORETICOS DE SUEROS NORMALES

Se han considerado sueros humanos normales aquellos en los que su fosfatasa alcalina total es inferior a 50 UI. Este techo ha sido establecido como consecuencia de un trabajo sobre control de calidad y normalidad de parámetros bioquímicos en la C.S. "1º de Octubre" en 1.975. Los sueros procedían del Servicio de Medicina Preventiva. El estudio comprendía 345 casos y la normalidad quedó fijada en el intervalo de 2 DS respecto a la media. Para completar la casuística de los grupos sanguíneos fue necesario recoger sueros procedentes del Banco de Sangre; algunos de estos sueros rebasan las 50 UI.

No se han incluido niños en el grupo de sueros normales por considerar que su fisiología respecto a los procesos de la fosfatasa alcalina difiere a los adultos.

La distribución de frecuencias de la actividad fosfatásica de los sueros, con un intervalo de 5 UI, proporciona una curva principal campaniforme, seguida de una perturbación en los valores superiores a 50 UI (Apartado 5.1.4.). Esta anomalía en la distribución puede interpretarse como debida a sueros de sujetos con alguna lesión orgánica.

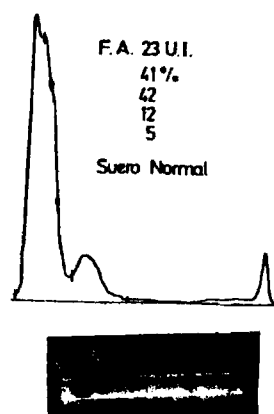
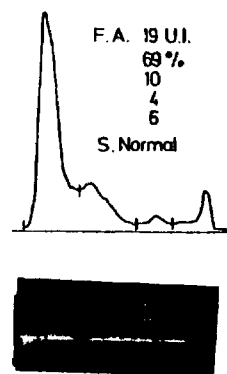
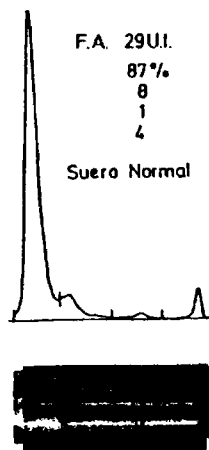
Con esta metódica, los geles de los sueros normales dan lugar a un número variable de bandas. Se han obtenido geles con un mínimo de dos bandas y un máximo de ocho. La distribución de fre-

cuencias según el número de bandas es decreciente. Se han ensayado diversas ecuaciones que satisficieran a la distribución y se ha encontrado que el máximo ajuste se alcanza con una ecuación del tipo $y = a + bx + cx^2$ (Apartados 5.1.2. y 5.1.3.).

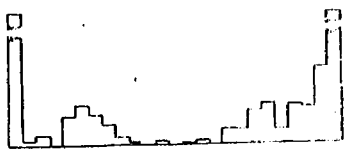
Si se relaciona la actividad fosfatásica de los sueros y el número de bandas en el gel, se observa que el valor medio de la F.A. es muy análogo en los grupos que constan de 2 a 5 bandas y que la actividad fosfatásica aumenta con el número de bandas en el gel (Apartado 5.1.4.). Lo cual sugiere la idea de que hasta cinco bandas, el suero puede considerarse normal y que un número elevado de bandas en el gel hace sospechar sueros de sujetos con alguna afección.

Se ha mencionado anteriormente que los sueros normales pueden dar lugar a geles con un número variable de bandas. Otro hecho observado es que cuando el número de bandas es superior a dos, una en el punto de aplicación y otra en la zona anódica, las bandas intermedias se sitúan en diversas posiciones del gel. Ante esta circunstancia solo cabe describir el espectro electroforético del gel en términos estadísticos, señalando en que lugares del mismo las bandas se colocan preferencialmente. Como las bandas intermedias pueden ser más de una, entonces se tendrán que considerar modelos estadísticos de geles con 3,4,... bandas.

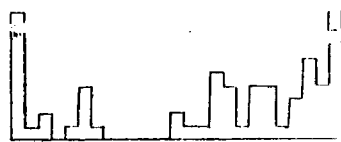
Como ejemplos de geles con 4 bandas en distintas posiciones, a continuación se muestran fotografías de los geles y gráficos densitométricos.



que en la casuística de 94 sueros origina el siguiente histograma de la distribución de frecuencias con el intervalo del 4% del recorrido de la banda anódica. Se ha elegido dicho intervalo para poder observar la variabilidad de las bandas.



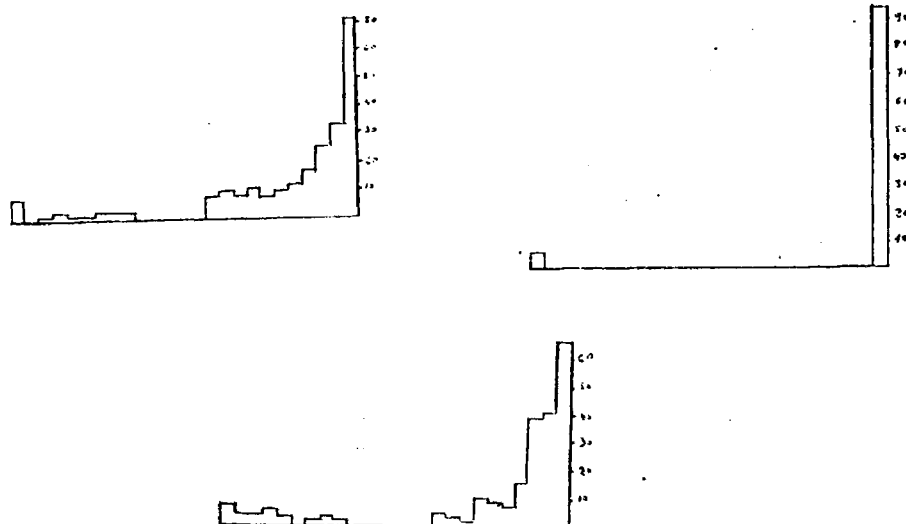
Los histogramas correspondientes a 3, 5, 6 y 7 ban
das, así como el general, figuran a continuación

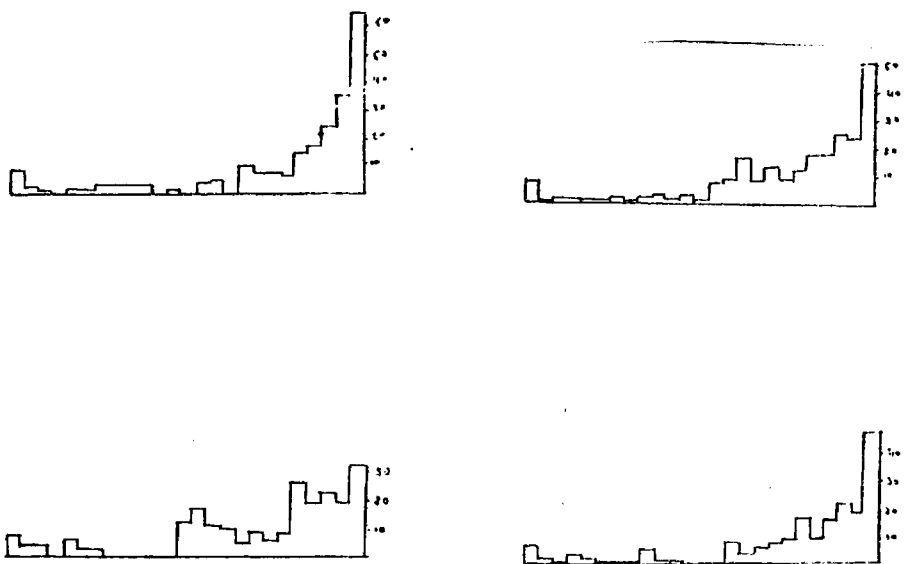


Las actividades fosfatásicas de las fracciones electroforéticas en los geles, AF, se obtienen por pérdida densitométrica de las bandas, como ya se ha indicado en la discusión de la metodología. Se supone que el colorante formado en cada banda es proporcional a la cantidad de la enzima existente en dicha banda y que la actividad de cada fracción fosfatásica o iso-enzima es análoga para este sustrato.

Los modelos electroforéticos de las actividades fosfatásicas de las bandas se han confeccionado con el mismo intervalo que en los modelos posicionales, sustituyendo en estos la frecuencia de cada banda por el valor medio de la actividad fosfatásica. Estos valores medios de la AF presentan una gran dispersión que en los protocolos se indica mediante la desviación standard DS. En estos modelos, una banda cualquiera, de encontrarse en gel, tendría estadísticamente esa AF.

El modelo general estadístico de la actividad fosfatásica de las bandas en el gel, así como los modelos con 2, 3, 4, 5, 6 y 7 bandas figuran conjuntamente a continuación:





De los modelos posicionales como en los de actividad fosfatásicas se pueden deducir las siguientes conclusiones:

- El modelo genral de frecuencias da una imagen de las posibles bandas fosfatásicas que podrían aparecer en el gel. Siempre existen por lo menos dos bandas, la catódica en el punto de aplicación del suero en el gel y la anódica; este tipo de espectro electroforético es el de mayor frecuencia. En sueros normales, las bandas intermedias se sitúan en determinados lugares preferenciales, la posición de mayor probabilidad se encuentra en las proximidades de la banda anódica. Con una frecuencia menor aparecen bandas en la zona del 50 al 80 % del gel y en la zona del 10 al 40 % que dada la irregularidad de las posiciones y su extensión en estas últimas zonas hace sugerir la idea de la existencia de bandas de varias caracterís

ticas similares.

- Los modelos de 3,4 y 5 bandas son similares al modelo general de frecuencias, lo cual hace suponer que estos espectros son representativos de sueros normales, que en esta casuística incluyendo los espectros con dos bandas comprenden el 95 % de los casos. En los modelos correspondientes a 6 y 7 bandas aparecen bandas con una mayor frecuencia en la zona del 50 al 80 % del recorrido de la banda anódica.
- Respecto a la actividad fosfatásica de las bandas en gel hay que destacar la gran dispersión de los valores medios de la AF. Una característica general en el modelo es que la banda catódica se mantiene constante en el valor medio de AF, de 7 a 8 %, con un grado de dispersión pequeño e independiente del número de bandas. La banda anódica contiene el mayor porcentaje de la actividad fosfatásica con un valor medio del 70 %, siguiéndola en actividad la banda situada en su proximidad que en el modelo general llega a un 30 % de la actividad total. Las bandas posicionads en la zona 50 al 80 %, tienen una actividad media pequeña, alrededor de un 10 %, y el grupo de bandas situadas en las proximidades de la catódica sólo ascienden a un 5 % de la AF total.
- A medida que aumenta el número de bandas la actividad fosfatásica se desplaza a la zona del gel del 50-80 %, con excepción del modelo de 3 bandas en el que la AF se localiza en la región del 80 al 96 %.

En la bibliografía consultada no se han encontrado referencias que aludieran al sexo de los sujetos estudiados. En este

trabajo, se han encontrado algunas diferencias en los espectros electroforéticos del gel.

La fosfatasa alcalina total es mayor en los sueros de los varones que en las mujeres. La diferencia de los valores de la FA resulta significativa al aplicar el criterio del "t" de Studen a la probabilidad del 95 %. Teniendo en cuenta el número de bandas en los geles, se observa que cuando aumentan el número de estas, asimismo aumenta la cantidad de la fosfatasa alcalina en los sueros correspondientes. Esto último, confirma lo ya indicado anteriormente. La frecuencia del número de bandas en los geles es algo diferente en varones y en mujeres; hay una mayor frecuencia con dos bandas en mujeres, con tres bandas presentan igual proporción en ambos sexos, mientras que los geles con muchas bandas es algo más corriente en varones. (Apartado 5.1.3.).

La posición preferencial de las bandas en los geles difiere algo con el sexo. En general, se observa una mayor frecuencia de la banda situada cerca de la anódica en varones que en mujeres, hecho que se acentúa en los espectros de 3 o 4 bandas. Otra diferencia observada en los modelos de 3 y 4 bandas es el pequeño predominio en las mujeres de bandas situadas entre el 70 y 84 % (de origen intestinal, posiblemente debidas a causas fisiológicas por estreñimiento. No se aprecien discrepancias en los demás modelos con diferentes bandas y sexo respecto al modelo general.

La distribución de la actividad fosfatásica en los geles es muy análoga en varones y mujeres, si bien en los modelos de 5 y 6 bandas se apreciaba un ligero desplazamiento de la actividad fosfatásica en los varones hacia la zona del 50-80 %.

La mayor frecuencia posicional de la banda próxima a

la anódica en varones, banda que más adelante se identificará como de origen óseo, puede ser debido a que en los varones existe una mayor masa esquelética, osteogénesis (actividades físicas y muscular) y hormonal.

Las posibles implicaciones de la edad asimismo han sido objeto de estudio, aun cuando se menciona poco en la literatura. En la casuística de este trabajo solo se dispone de 142 sueros con indicación de la edad. Casi el 50 % corresponde a una edad de 20-30 años, un 25 % a 30-40 años y el resto, un 10 %, a mayores de 50 años. Por tanto se trata de una población joven con una media de 35 años.

Los hallazgos son:

- La fosfatasa alcalina total de los sueros aumenta en forma progresiva con la edad, lo cual puede explicarse por un aumento del riesgo de desórdenes, sobre todo de origen óseo.
- En geles, en el grupo de 30-40 años hay preferencia para situar bandas en la zona del 10 al 40 % debido a la mayor frecuencia en estas edades de trastornos hepato-biliares y en el intervalo de 40 a 50 años la posición preferente de las bandas se encuentra en la región del gel del 50-80 %, atribuidas a excesos alimenticios, en ambos casos considerando el modelo general. Los demás grupos de edades se apartan muy poco de la distribución general.
- La actividad fosfatásica en la región del gel comprendida entre 50 al 80 % en edades hasta 40 años es algo superior a la media respecto a la distribución general.

por las mismas causas que en el apartado anterior. En otras zonas, la actividad fosfatásica, en todas las edades, es muy semejante al modelo general.

- El aumento de bandas en la región del 10-40 % del gel en las edades comprendidas entre 30 y 40 años, bandas que más adelante se indicará como pertenecientes a fracciones hepato-biliares, podría explicarse a que a esa edad empiezan los problemas de colecistitis y colelitiasis.

Los grupos sanguíneos influyen en la distribución y número de bandas en las fracciones de la fosfatasa alcalina. Esta influencia no es coincidente entre los autores, aun cuando la idea imperante es que los grupos O y B presenten un aumento de bandas intestinales con relación a los otros grupos y por consiguiente un aumento en el número de bandas en el soporte. Posiblemente, estas diferencias puede que sean debidas a las técnicas empleadas.

Con la metodología propuesta en este trabajo se ha realizado un estudio para dilucidar o aportar otros hechos en esta cuestión. Comprende 409 casos, procedentes del Banco de Sangre, y que como se indica en el apartado 5.1.5. no corresponden fielmente a una toma de muestra aleatoria, ya que ha habido necesidad de completar el número de casos en determinados grupos sanguíneos poco frecuentes. Se ha tenido en cuenta los grupos O, A₁, A₂, B, A₁B y A₂B que con el factor Rh forman 12 subconjuntos.

El valor medio de la fosfatasa alcalina total en los sueros difiere algo de unos grupos a otros. Aplicado el "t" de Student a los valores medios de la F.A. de los grupos formados con Rh positivo y negativo, su diferencia no es significativa al 95 % de probabilidad. Si el mismo criterio estadístico se aplica a todas las po-

sibles combinaciones de los distintos grupos sanguíneos se encuentra que las diferencias de las medias significativas para algunas combinaciones en que intervienen los grupos A_1B y A_2B que tienen una F.A. pequeña frente a los grupos O y B, principalmente, que tienen una F.A. más alta.

El número de bandas en los geles depende del grupo sanguíneo. Este hecho ha sido observado por diversos autores en forma cualitativa, al menos no se ha encontrado referencias en otro sentido. En este trabajo, se ha aplicado la prueba del χ^2 para decidir la dependencia del número de bandas a los grupos sanguíneos con el resultado de que debe aceptarse la dependencia de ambos factores al nivel de $\alpha = 0,05$. Por tanto debe admitirse que los grupos sanguíneos O y B producen un número superior de bandas en el gel que los otros grupos.

En los geles, asimismo, se observa ciertas preferencias de los grupos sanguíneos en la distribución de las bandas. Así, la agrupación A sitúa bandas pequeñas en la zona catódica mientras que la B lo hace en la zona anódica en la que destaca una banda muy frecuente pero de pequeña actividad fosfatásica que corresponde a la fracción osea; en el grupo sanguíneo O, las bandas se distribuyen siguiendo el modelo general si bien se advierte cierta preferencia por la región catódica.

Un análisis de la distribución de la actividad fosfatásica en los geles considerando los grupos sanguíneos hace destacar una mayor actividad del grupo A en la zona anódica, en la posición de la fracción osea, y que la actividad de los grupos O y B en la región del 60-80 % es algo superior a la de los otros grupos, lo que sugiere la idea de una actividad mayor gastro-intestinal en esos grupos, sobre todo el grupo O.

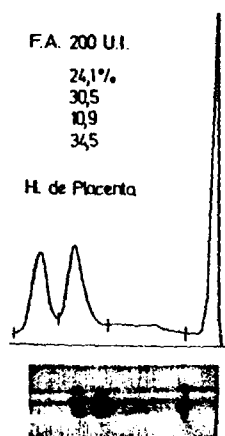
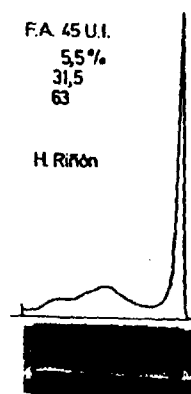
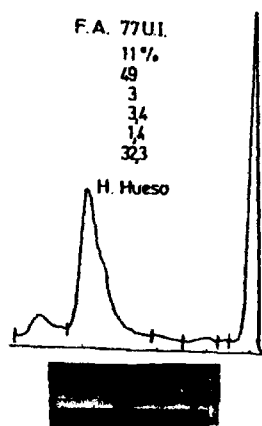
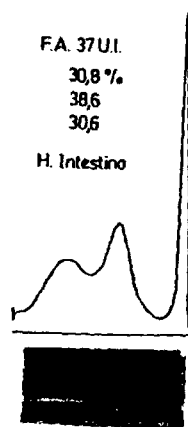
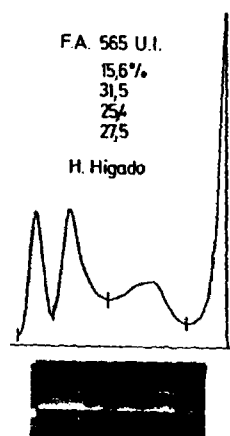
6.3. MODELOS ELECTROFORETICOS DE HOMOGENADOS DE ORGANOS.

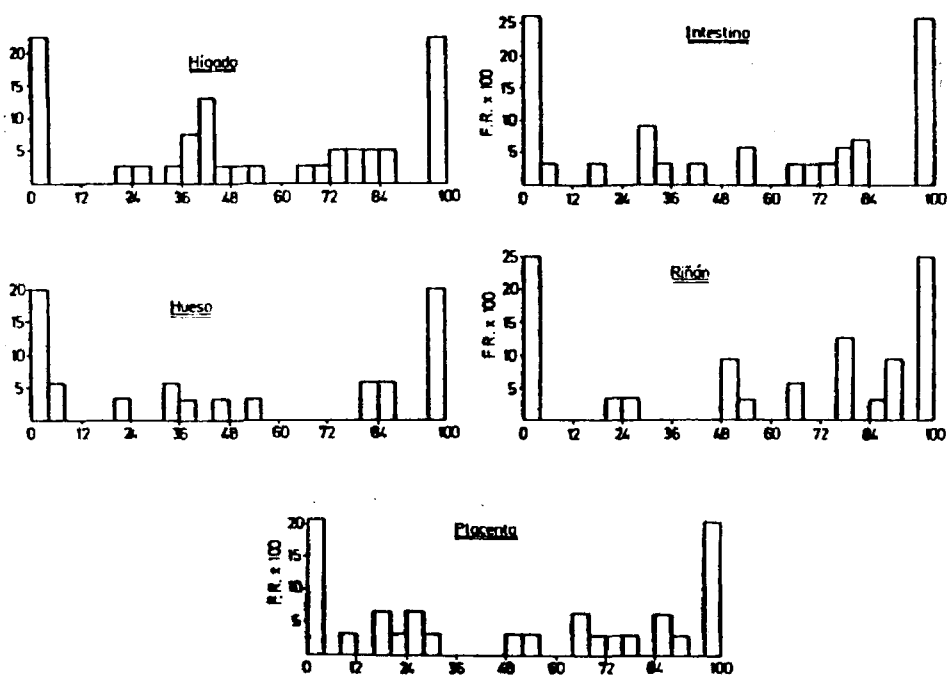
Se estudian los homogenados de órganos como fuentes principales de fosfatasa alcalina. De la posición y actividad fosfatásica de sus fracciones en el gel se pretende obtener información para la identificación de bandas. Se ha puesto gran interés en evitar desnaturalizaciones en la enzima, así en las biopsias, inmediatamente después de ser tomadas las muestras en quírófanos, eran conservadas en hielo y tan pronto como era posible troceadas las piezas y congeladas a -20°C hasta su utilización y homogeneización; en necropsias, sólo se han utilizado muestras en aquellos casos en que la autopsia se realizaba dentro de las pocas horas del fallecimiento.

La fosfatasa alcalina de los homogenados muestra una alta dispersión de valores, tanto en biopsias como en necropsias, variabilidad que se atribuye a las dificultades en la homogeneización y a la pequeña muestra para la determinación de la F.A. que puede dar lugar a tomas diferentes de la enzima.

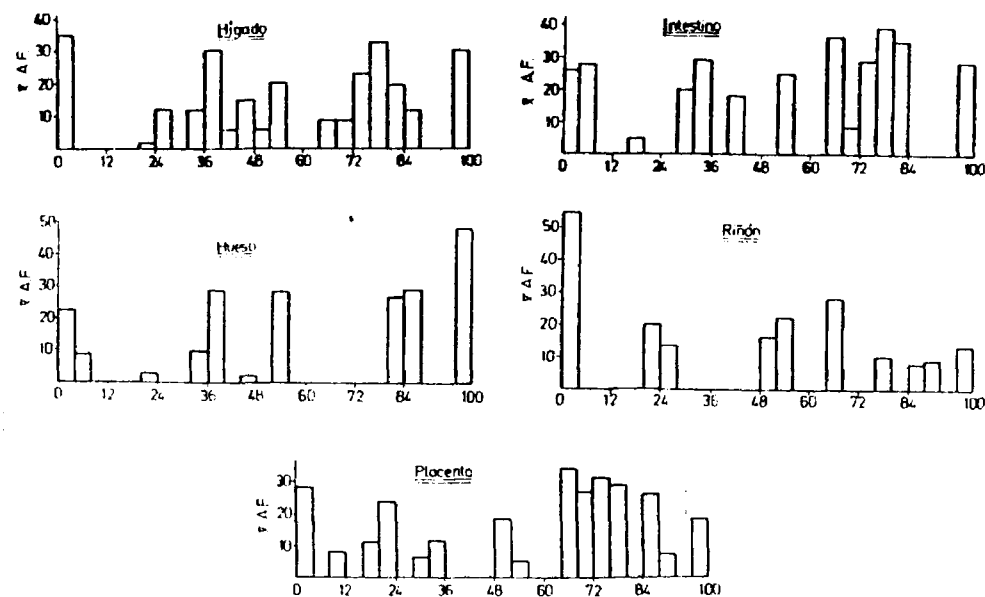
El número de bandas en el gel de los homogenados se aparta del modelo sérico. Hay un predominio de geles con 3 y 4 bandas, se encuentran muy pocos geles con más de 5 bandas y prácticamente no existen geles con 2 bandas.

En la casuística estudiada, los modelos posicionales de bandas de los distintos homogenados de tejidos son los siguientes:





La actividad fosfatásica media de las bandas en los anteriores modelos posicionales es:



Puede observarse que los modelos electroforéticos de los homogenados difieren unos de otros. Como característica general, en cada órgano se encuentran presentes casi todas las fracciones fosfatásicas pero en distintas proporciones.

En el homogenado de hígado destaca, además de las bandas catódica y anódica varias bandas en la región del 20 al 50% y otro grupo en la zona 70-86 % del gel. La mayor actividad fosfatásica se encuentra en la banda catódica y un poco inferior en magnitud en la banda anódica. En la zona del 20 al 55 % la ímagen parece dar la impresión de existir varias bandas afines. En la región del 65 al 85 % se encuentra una banda ancha.

El homogenado de intestino se caracteriza por un grupo de bandas situadas en la zona 65-84 % del gel con gran actividad fosfatásica muy superior a las bandas catódica y anódica. Asimismo, en forma aislada aparecen bandas que se sitúan en la zona del 16 al 55 % con bastante actividad. Finalmente, es de mencionar una banda que se presenta con alguna frecuencia en las proximidades de la banda catódica y que cuando existe es de gran actividad.

En el homogenado de hueso aparece una banda típica, estrecha, en la zona 80-88 % de gran actividad fosfatásica. Otra particularidad es la pequeña actividad de la banda catódica, muy inferior a la de otros homogenados. Por otra parte, aparecen diseminadas bandas en la zona del 20-55 %, algunas con bastante actividad fosfatásica.

Las bandas del homogenado de riñón, se encuentran sin formar bloques, recordando a una mezcla de otros homogenados tanto en posición como en actividad. La característica principal es la gran actividad de la banda catódica la cual sobresale en actividad a todas las demás.

Se debe señalar que el buffer de los homogenados es de carbonato-bicarbonato, diferente al buffer fisiológico del suero, lo que podría perturbar la composición de las fracciones de la fosfatasa alcalina y no tener correspondencia con las del suero.

Más adelante, al resumir la información para identificación de bandas, se volverá a tratar de los espectros de los homogenados de órganos.

6.4. MODELOS ELECTROFORETICOS DE SUEROS PATOLOGICOS

La finalidad de este trabajo, como se ha indicado en el capítulo 3, es la obtención de modelos de bandas de actividad fosfatásica, en gel de acrilamida, de sueros procedentes de personas con desordenes que afectan a la fosfatasa alcalina y que de la comparación de estos sueros patológicos con los modelos de sueros normales se puedan inferir conclusiones de utilidad en la clínica.

Un estudio completo del anterior propósito es una labor que comprendería un número elevado de afecciones y por ello de muestras que rebasaría los límites normales de una memoria académica, por tanto, el presente estudio es solo un punto de partida en el que, como un muestrario, se señalan las posibilidades de este procedimiento.

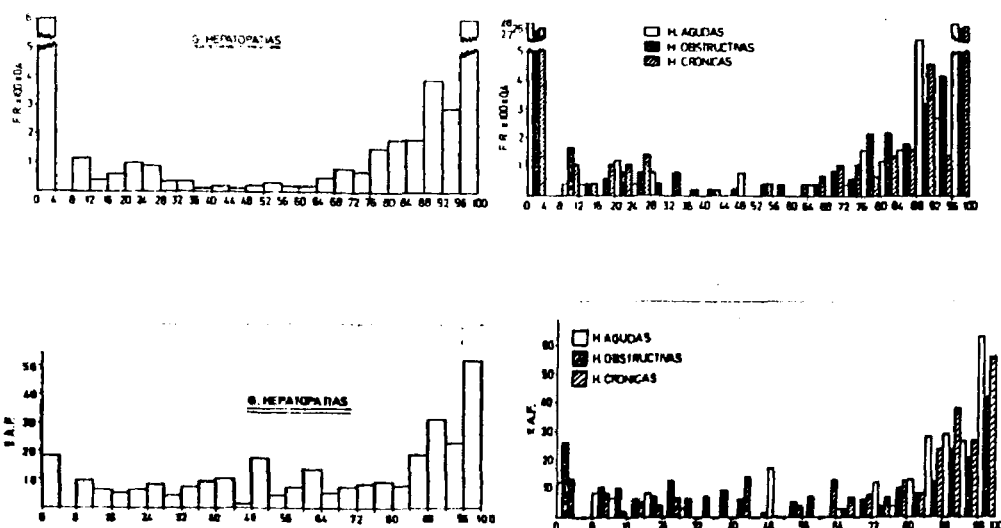
Los sueros patológicos, en número total de 408, están agrupados en afecciones hepáticas, renales, pulmonares, óseas, pancreáticas y neoplasias, que a su vez comprenden otros tipos de enfermedades más concretas (apartado 5.3.). Un grupo especial lo constituyen 16 muestras de suero de niños, incorporadas a este trabajo con la finalidad de coadyuvar a la identificación de la fracción ósea.

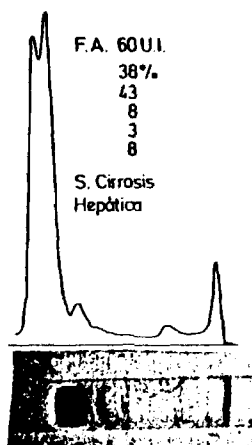
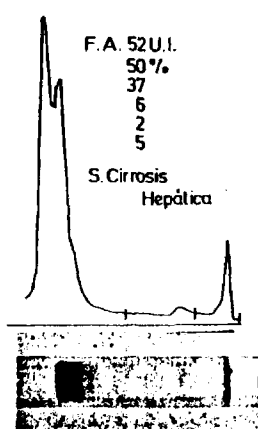
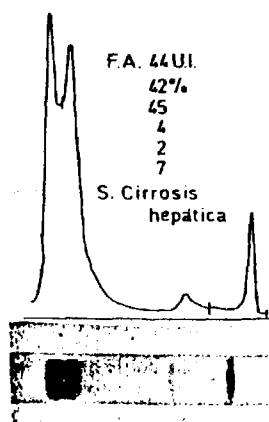
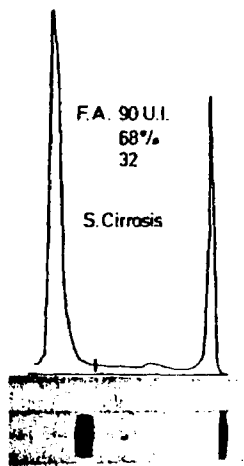
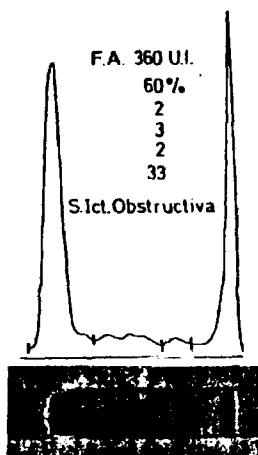
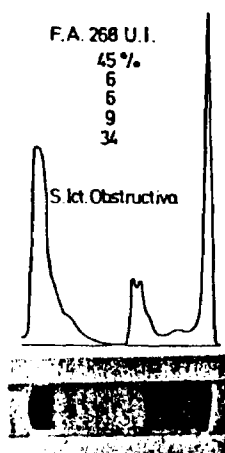
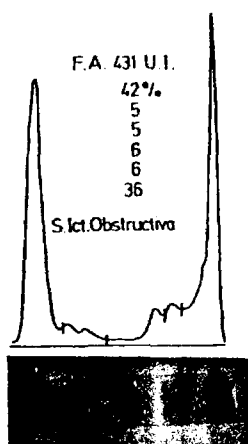
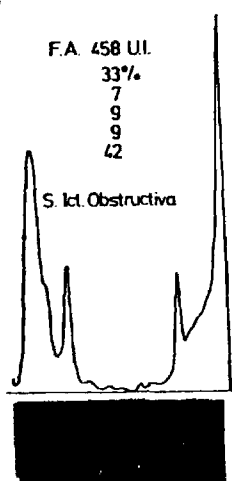
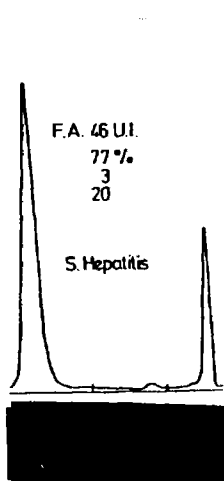
En los sueros patológicos el número de bandas en los geles difiere de la distribución de los sueros normales, lo más corriente es que los geles tengan de 3 a 5 bandas, prácticamente no existen de dos bandas, siendo muy frecuente los geles con muchas bandas. Esto último puede considerarse como una característica general de los sueros patológicos, de tal forma que los sueros con alta cantidad de fosfatasa alcalina total es de esperar geles con muchas bandas.

Sueros de enfermos hepáticos

Estos sueros se han dividido en tres subgrupos principales: procesos hepatocelulares agudos, crónicos y aquellos en que predominan un cuadro obstructivo.

Los modelos de frecuencias de bandas y de actividades fosfatásicas son:





Se observa cierto parecido entre los modelos generales de sueros normales con 5 bandas y el de hepatopatías, con un ligero desplazamiento, en este último, hacia la banda catódica del grupo de bandas de dicha región. Por otra parte, la AF entre ambos modelos presentan diferencias; en las hepatopatías la banda catódica tiene un valor medio muy superior, así como las de la región del 10 al 50 %, que como veremos más adelante corresponderán a las hepatobiliares, y finalmente, muestran mayor actividad la fracción ósea que en los sueros normales.

Individualmente, cada subgrupo tiene características propias. Los espectros electroforéticos de las obstructivas se diferencian claramente de los otros dos subgrupos en que la banda catódica y bandas hepatobiliares tienen mucha mayor actividad, así como la aparición de bandas con bastante frecuencia en la zona del 76 al 85 % si bien son de pequeña actividad. En los procesos agudos es frecuente encontrar una banda en la zona de la fracción ósea con una actividad fosfatásica no muy alta y sobre todo es típico la gran actividad de la banda anódica. En procesos crónicos, los modelos posicionales así como de AF tienen una imagen en la que se encuentra presente, con bastante frecuencia, en la región de la banda ósea y de gran actividad.

En las hepatopatías agudas, presentan bandas hepáticas (la anódica y la catódica), como consecuencia de su proceso celular en el cual se produce, edema, hiperemia, permeabilidad de membrana, necrosis, regeneración celular, etc.

En las hepatopatías obstructivas incluimos las litiasis y las colangiohepatitis. El daño celular en estos casos es secundario a la obstrucción, como consecuencia se produce una regurgitación de la bilis, no drenando a las vías biliares mayores sino volviendo a los capilares sanguíneos y de aquí va a la circulación

general; produciendo un aumento de las fosfatasas alcalinas biliares, con un aumento de bilirrubina y otros factores de eliminación vía biliar.

El aumento de la bilirrubina satura el enzima glucoronil-transferasa con lo cual la excreción de la bilirrubina está dificultada.

La presencia de la banda ósea en las hepatopatías crónicas puede tener la siguiente explicación: En esta enfermedad existe una osteoporosis, pérdida de matriz proteica y calcio de hueso. En otros casos hay una osteomalacia como consecuencia de la mala absorción de vitaminas liposolubles. Estas vitaminas son A, E, D₃ y K, sobre todo la vitamina D₃ debido a que las sales biliares no son adecuadamente excretadas por el hígado al intestino. Estas sales retenidas en el organismo producen prurito.

Hay que tener en cuenta que las sales biliares, al no ir por su vía general, produce una mala absorción de grasas y de vitaminas liposolubles dando lugar a una esteatorrea.

Sueros de enfermedades oseas y niños

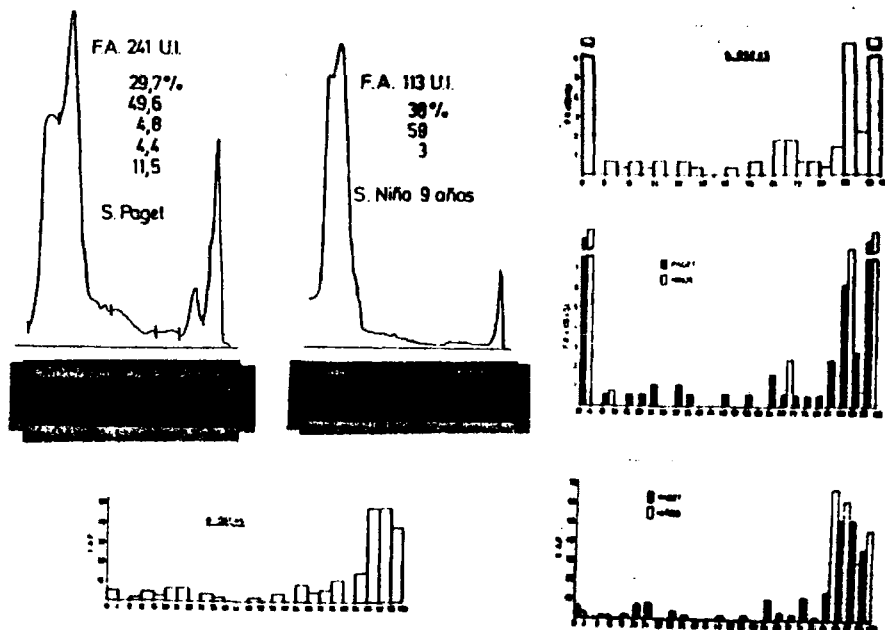
El estudio de las osteopatías se ha centrado en la enfermedad de Paget, principalmente en la forma activa, por considerar que es representativa de alteraciones en los osteoblastos. Como complemento se incluyen niños, que como es sabido, tienen en suero una F.A. normalmente alta muy superior a los adultos, y que se atribuye a un elevado metabolismo óseo.

La fosfatasa alcalina total en la enfermedad de Paget, en estado de actividad, alcanza valores medios de unos 450 UI., muy superiores a la media de las enfermedades oseas, mientras que

en estado inactivo, su F.A. se halla en el límite superior de los sueros normales. El valor medio de la F.A. de los niños es de alrededor de 100 UI. con una dispersión pequeña. En las demás osteopatías la F.A. es variable, generalmente con valores relativamente altos.

El número de bandas más frecuente es de 3. No se encuentran geles con dos bandas.

Los modelos electroforéticos de frecuencia de bandas así como de la actividad de las mismas, son los siguientes:



El modelo típico de las osteopatías, sobre todo en la enfermedad de Paget y en niños, se caracteriza por la presencia de una banda predominante, ancha, en la región del 84-94 % del gel, con una actividad fosfatásica mucho más elevada

que la anódica, de tal manera que esta última, a veces, aparece como un hombro. Tan característica es la banda que esta fracción fosfatásica se identifica como ósea.

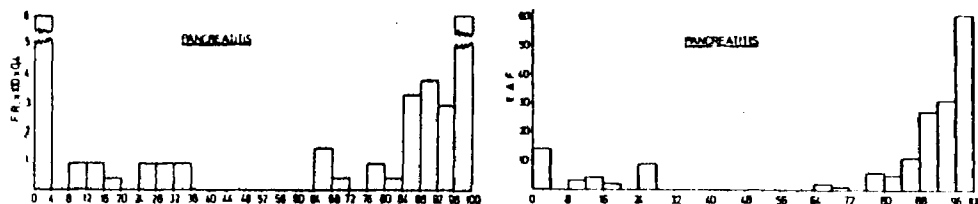
En las osteopatías, como por ejemplo, el Paget existe destrucción y regeneración ósea acelerada, con depósitos de calcio en la matriz o sea anómala, apareciendo frecuentemente fracturas.

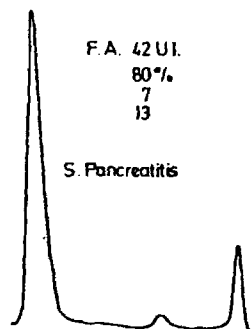
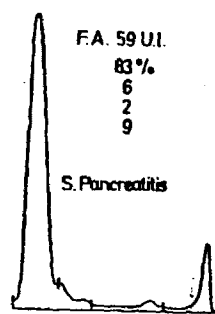
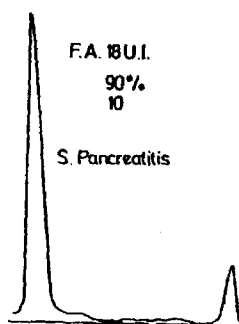
Sueros de enfermedades pancreáticas

Se estudia la pancreatitis como afección más corriente. Los sueros de estos enfermos tienen una actividad fosfatásica algo superior a los sueros normales.

En los geles, la distribución del número de bandas es análoga a la de los sueros patológicos, o sea de 3 a 5 bandas, si bien se encuentran sueros con únicamente dos bandas como era de esperar dada su baja F.A.

El modelo espectral del gel en las pancreatitis es muy semejante a los modelos generales de sueros normales con algunas diferencias tales como mostrar una banda con alguna frecuencia en la región ósea pero con un valor medio de la A.F. del mismo orden que en los sueros normales, y además una banda catódica con una A.F. doble que los normales





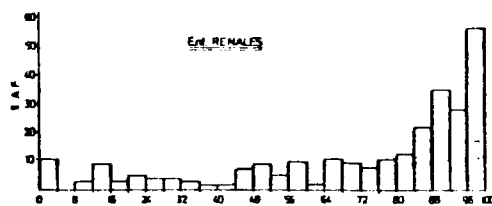
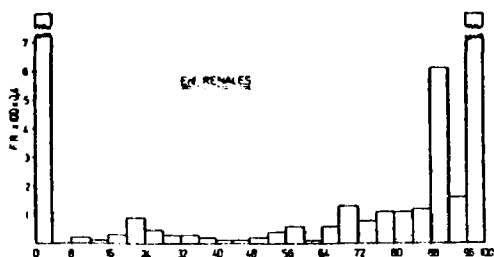
De entre las pancreatitis las producidas por cálculos por alcohol habrán alteraciones hepáticas y procesos obstructivos. En las crónicas, aparece el mismo síndrome que en los cirróticos crónicos, habiendo además formación de jabones intestinales que impiden la absorción del calcio.

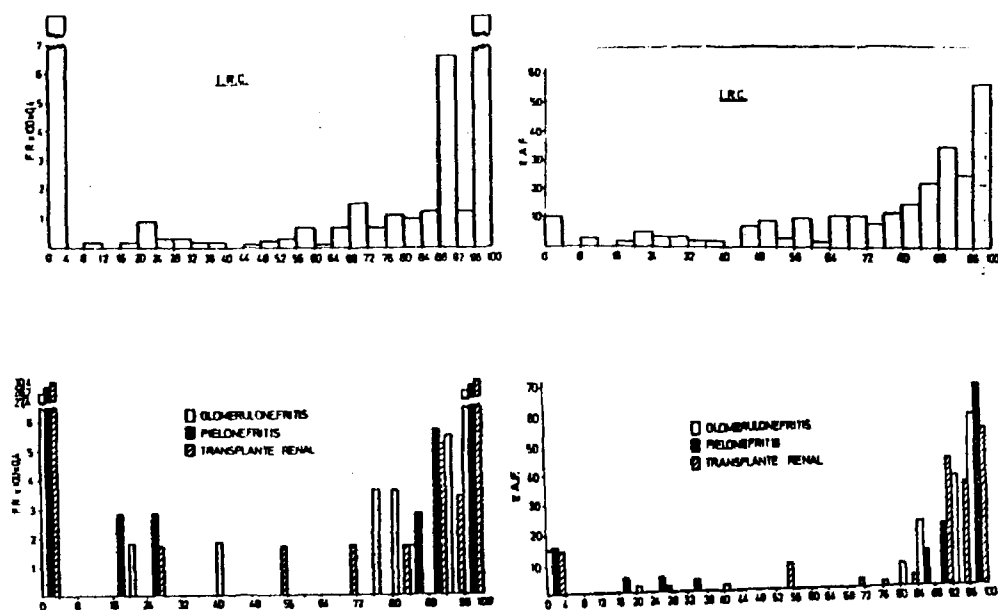
Sueros de enfermedades renales

Estas enfermedades cursan con una fosfatasa alcalina superior a los normales, habiéndose encontrado ser máxima en el fracaso renal agudo con valores que sobrepasan las 300 U.I., mientras que otros desórdenes como litiasis, trasplantes, etc. La F.A. es un poco superior a lo normal. La masa principal de sueros estudiados proceden de insuficiencias renales crónicas con un número de casos de 97 de un total de 117, por tanto, casi todas las conclusiones que se obtengan se extraerán de esta afección. Forman un grupo pequeño, pero interesante, las pielonefritis así como los trasplantes renales.

El número de bandas en los geles muestra un máximo en la zona de 3 y 4 bandas. Contrariamente a los demás sueros patológicos hay un alto porcentaje de geles con dosbandas.

Los modelos esquemáticos:





El modelo general de la distribución de frecuencias de bandas en las nefropatías es muy parecido al de las enfermedades óseas, apartándose de este último por contener abundantes bandas intermedias. La A.F. en la zona ósea es muy superior a los sueros normales pero sin llegar a las osteopatías; la AF de la banda catódica es por otra parte superior a la de los sueros normales.

Los modelos de la I.R.C., por ser una casuística muy mayoritaria resulta análoga al modelo general de las nefropatías. Dada la pequeña cantidad de muestras de las otras afecciones es aventurado extraer conclusiones, no obstante, puede señalarse que el modelo de la pielonefritis recuerda a procesos hepáticos, y que el trasplante renal y glomeronefritis hay exaltación de la fracción ósea.

Este aumento de la AF en la zona ósea puede tener la si-

guiente explicación: La mayoría de las afecciones renales están asociadas a una osteitis fibrosa debido a la existencia de una disfunción en la vitamina D₃ que modifica el metabolismo del Ca y en consecuencia altera la fisiología de la célula ósea. Por otra parte, a no transformarse la vitamina D₃ produce osteodistrofia renal y secundariamente una osteomalacia y osteitis fibrosa.

Las bandas de la F.A. en la pielonefritis recuerdan a los hepáticos, porque nuestros casos corresponden a pielonefritis yantogranulomatosa en las cuales parecen existir unas hepatopatías demostrables únicamente por procedimientos bioquímicos (STANLEY E. 1971).

En el trasplante renal y en la glomerulonefritis el isoenzimograma es similar al nefropata crónico.

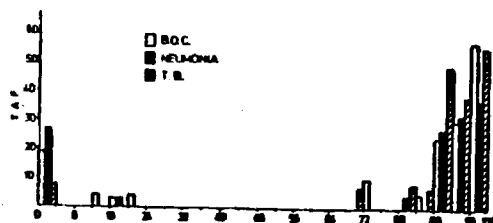
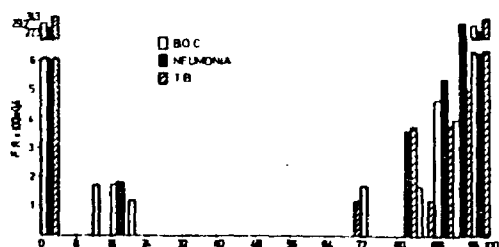
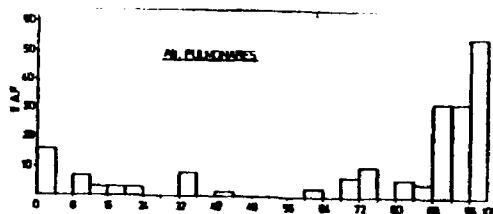
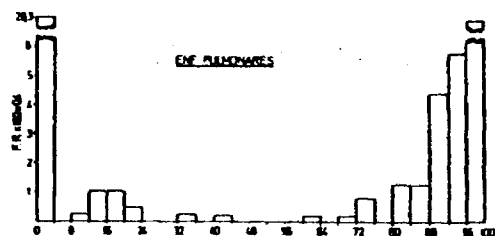
Sueros de enfermedades pulmonares

El pulmón además de ser rico en fosfatasa alcalina sus trastornos patológicos elevan generalmente, en sangre, el nivel de dicha enzima. Se hace el estudio con una casuística relativamente pequeña, 45 casos, en los que predomina la bronquitis obstructiva crónica con 20 casos.

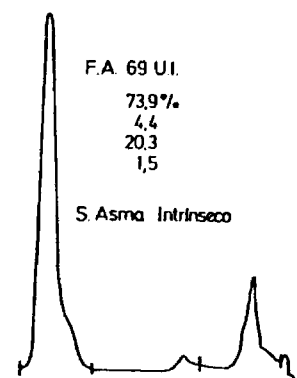
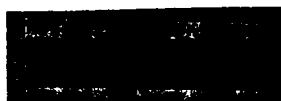
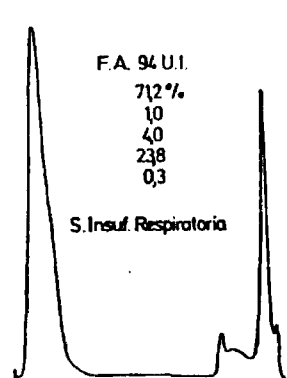
La F.A. media de estas afecciones es de 64 U.I., valor un poco superior a los normales y en los que las neumonías ostentan los valores máximos, cercanos a 100 U.I. En general, la dispersión de la F.A. en cada una de las enfermedades es baja.

En los geles, el máximo de bandas se encuentra, como en la mayoría de los sueros patológicos, en 3 y 4 bandas. Es de señalar que un 15% de los geles aparecen con dos bandas

Los modelos de estas enfermedades son:



Las fotografías de geles y su densitometría correspondiente se muestran a continuación:



Los modelos generales, tanto en la posición de las bandas como actividad de las mismas, difieren poco de los correspondientes modelos de normales con las salvedades de que la AF de la banda catódica es muy superior y que en la zona intermedia del gel presenta pocas bandas y que cuando existen tienen pequeña actividad; en la zona ósea hay un discreto aumento de la AF.

En los modelos de la B.O.C. destaca la presencia de bandas en la región hepatobiliar, así como una banda catódica con bastante actividad fosfatásica.

En tuberculosis pulmonar, hay un incremento de la AF en las bandas de la zona ósea y anódica. No se observa actividad fosfatásica en la región hepato-biliar.

Los modelos de las neumonías se caracterizan por tener la banda catódica muy elevada y en la zona ósea una AF alta, esta última casi de la misma magnitud que la anódica.

Bronquitis obstructiva crónica: en estos sujetos casi siempre existe cor pulmonale, insuficiencia cardíaca congestiva derecha, hígado de éstasis. Estos sujetos suelen ser fumadores.

Neumonías: existe un proceso séptico general por lo que puede estar afectado su hígado, la fracción ósea no es explicable, sólo podría ser en el caso de que estos procesos ocurren muy a menudo en sujetos viejos y en mielomas.

Sueros procedentes de neoplasias

Aun cuando el número de sueros con neoplasias es relativamente alto, 81 casos, dada la diversidad de tipos de tumores este estudio resulta incompleto y merece por su interés una mayor investigación. Entre las clasificaciones existentes, en este trabajo se han efectuado las agrupaciones según criterios anatómopatológicos de acuerdo a la I. del C. si bien consideraciones como el número de muestras de cada grupo, ha hecho que se reagruparan para su estudio en subconjuntos con las denominaciones genéricas de linfomas, Ca de órganos genitales, Ca de órganos digestivos y Ca de pulmón, con la casuística de 9, 28, 24 y 9 respectivamente.

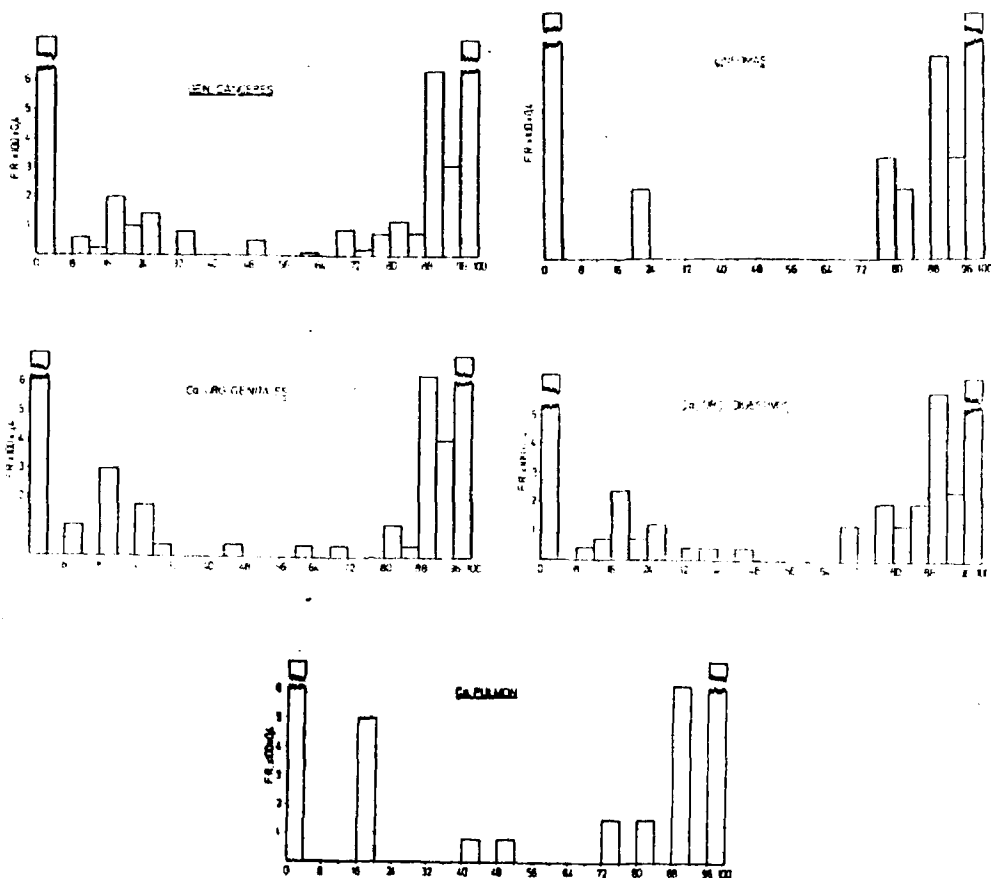
En este trabajo no se ha intentado identificar bandas consideradas como típicas de estas alteraciones como la de Regan, etc., aun cuando, en algunos casos, las características de algunas bandas hace sospechar de su existencia.

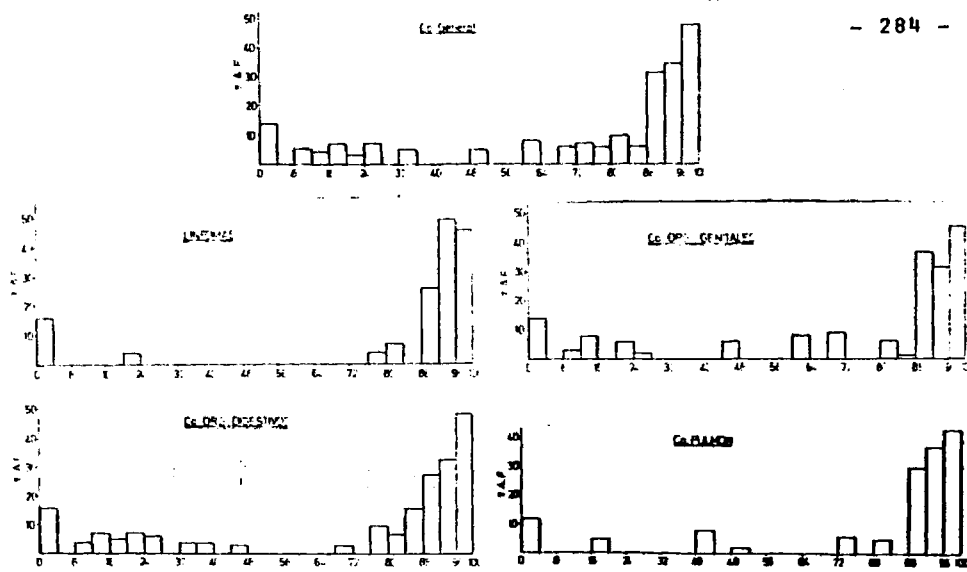
El valor medio de la fosfatasa alcalina de los sueros de neoplasias es alto, cerca de las 100 U.I., la dispersión de estos valores asimismo es alta. Los mayores niveles los muestran los tumores de páncreas, hígado y estómago que alcanzan las 200 U.I., mientras que los Ca de mama, pulmón y otros, tienen una F.A. un poco superior a lo normal. Los tumores derivados del tejido lin

foide y hematopoyetico son bastante activos en F.A., oscilando alrededor de las 100 U.I.

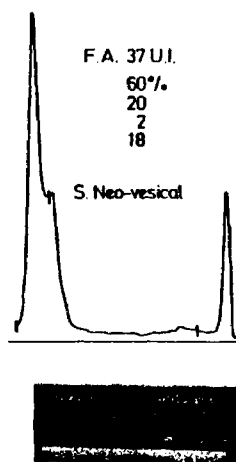
El número de bandas en los geles es grande, entre 3 y 5, no habiéndose observado geles con sólo dos bandas.

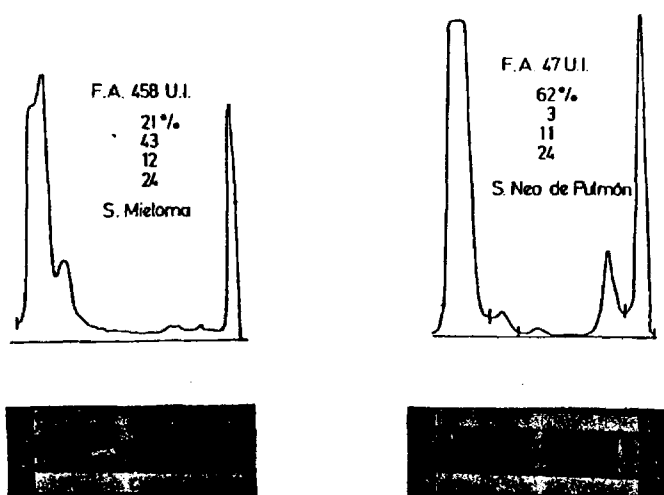
Los modelos posicionales de las bandas y los de AF de todas las neoplasias así como los grupos estudiados se indican a continuación:





Las fotografías de geles y su densitometría correspondiente se muestra a continuación:





Los modelos generales para las neoplasias se caracterizan principalmente por contener una fracción ósea aumentada, bandas frecuentes en la región hepatobiliar y una banda catódica asimismo aumentada.

Los modelos principales de cada tipo de neoplasia tienen una imagen muy parecida al modelo general divergiendo en algunas particularidades propias tales como en el grupo linfoma donde sobresale una banda muy frecuente en la zona 76-84 %, en el Ca de pulmón una banda muy nítida, con gran frecuencia, en la región 16-20 %; destacable asimismo, es que tanto en los linfomas como en el Ca de pulmón no se observan bandas en la región intermedia del gel.

Respecto a la actividad fosfatásica de las bandas en los tipos de tumores estudiados los modelos se diferencian algo entre

sí. En linfomas sobresale en actividad una banda situada en la posición de la ósea, que llega a ser tan intensa como la banda anódica lo que hace recordar una osteopatía. En los tumores de órganos genitales y digestivo se observa una marcada actividad fosfatásica en la región hepatobiliar.

La explicación del isoenzimograma sea debido a que, es tos casos no son recogidos al azar.

Todos ellos venían con el diagnóstico previo de cáncer, de diversa localización, y con metástasis óseas o hepáticas o am bas. Quizás sea ésta la razón de la aparición y aumento a veces, de las bandas citadas.

6.5. ENSAYOS CON INHIBIDORES

Es muy corriente en los investigadores la identificación de bandas en los isoenzimogramas mediante el tratamiento con inhibidores. En la fosfatasa alcalina se utilizan dos tipos de in hibidores: Los específicos y los inespecíficos. Estos últimos actúan sobre la estabilidad de la proteína enzimática o bien originando alguna alteración en los centros activos. Los agentes generalmente empleados son temperatura-tiempo, inactivación por urea, EDTA; todos ellos, se han ensayado en este trabajo. La acción de estos inhibidores inespecíficos sólo se puede describir como porcentaje de la actividad residual después del tratamiento y como quiera que la respuesta de cada banda, o fracción enzimática, a la inhibición es de diferente magnitud a un determinado inhibidor, la utilidad de estos inhibidores es relativamente pequeña:

De mayor interés práctico son los inhibidores específicos, siendo para la fosfatasa alcalina el más empleado la L-Fenilalanina. De todas las fracciones que componen esta enzima sólo in-

hibe a la intestinal, y por ello se utiliza principalmente para distinguir las fracciones intestinales de las demás componentes; este ha sido el propósito de los ensayos con L-Fenilalanina en este trabajo. Por la razón anterior, no se han ensayado otros aminoácidos, asimismo, específicos descritos en la literatura. En el momento presente, la fracción intestinal no ha encontrado interés en Clínica.

Con características de inhibidor específico es el tratamiento con neuroaminidasa que al eliminar grupos siálicos en las fracciones fosfatásicas, excepto en la intestinal, altera la carga neta de la proteína-enzima y, en consecuencia, hace disminuir sus movibilidades electroforéticas. La acción de la neuroaminidasa viene a ser complementaria al tratamiento con L-Fenilalanina.

Como se indica en el apartado 5.4. la identificación de bandas en el espectro electroforético en este trabajo, se ha realizado principalmente mediante comparaciones en la posición y actividad fosfatásica de las bandas entre los modelos obtenidos con sueros de enfermos de homogenados de órganos, no obstante, se han efectuado algunos ensayos con inhibidores con la finalidad de confirmar los resultados hallados y obtener alguna información, por tanto, estos ensayos son incompletos y deben considerarse como previos. Como novedad a la metodología clásica es efectuar, siempre que ha sido posible, las inhibiciones en el mismo gel, una vez separadas las fracciones fosfatásicas, por difusión de soluciones. Este proceder de inhibición "in situ" no se ha encontrado en la literatura y se considera ventajoso.

Los resultados hallados en los ensayos con inhibidores se pueden resumir así:

- L-Fenilalanina: Se producen desdoblamientos de la ancha banda anódica; se interpreta como que en esa zona exis

te una banda con características de la fracción intestinal. Se confirma la presencia de bandas intestinales en la región 50-80 % del gel. Este inhibidor parece estimular la actividad en otras zonas, como en la banda catódica. Los homogenados presentan mayor resistencia que los sueros a la inhibición.

- Urea A bajas concentraciones tiene un efecto activador sobre todo en la región intestinal. Por el contrario, a concentraciones superiores a 3 M, se producen inactivaciones selectivas, siendo la más afectada la ósea. Los homogenados presentan mayor resistencia. El efecto de la urea parece ser como si alterara la disposición de las capas iónicas externas en las cercanías de los centros activos o bien a la geometría de estos, o facilitar el reagrupamiento con formación de formas moleculares con mayor actividad.

- Temperatura

El tratamiento utilizado es el seguido por la mayoría de los investigadores, o sea 56°C a los tiempos de 15 y 30 minutos. Se confirma la pequeña estabilidad de la fracción ósea, la resistencia de las intestinales en la zona 50-80 % y bandas de sueros de neoplasias. A los 30 minutos, la inactivación es muy alta quedando bandas resistentes en las zonas antes indicadas, lo cual sugiere la existencia de diversas bandas de comportamiento análogo a las de tipo intestinal, distribuidas en distintos lugares del gel.

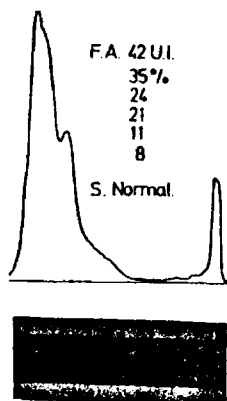
- EDTA: La inactivación por este agente secuestrante de iones metálicos confirma que la fosfatasa alcalina es una metalenzima. La inactivación es total a la concentración

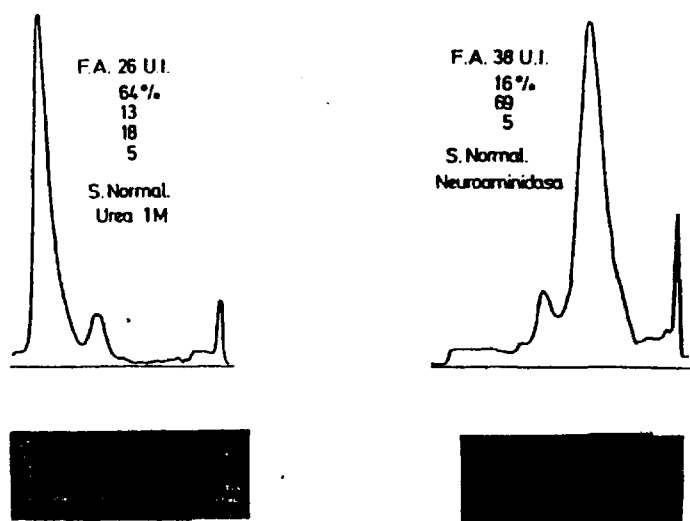
ensayada, la cual, es la que se señala en la literatura. Los ensayos deben realizarse a concentraciones inferiores para hallar posibles grados de competición de los iones por el EDTA y las distintas fracciones de enzima.

- Neuroaminidasa:

Los ensayos con este agente confirman lo hallado por los investigadores. Quedan sin afectar las bandas correspondientes a la zona del 50-80 % del gel y el resto de las bandas al perder movilidad electroforética se sitúan en las proximidades de la banda catódica.

Como ejemplo de ensayos con inhibidores en un mismo suero, figuran a continuación





Mezclas de sueros y homogenados

El estudio de mezclas de sueros, homogenados, entre sí y combinaciones entre ambos, obedece a diversos planteamientos. Inicialmente, se buscó si las isoenzimas de los tejidos eran análogas, o mejor dicho, si presentaban las mismas propiedades que las encontradas en el suero; así como la obtención de alguna información que pudiera indicar la presencia de sustancias en el suero con propiedades inhibitoras de la fosfatasa alcalina. Posteriormente, se amplió el estudio con propósitos de identificación de bandas en el gel.

En la realización de los ensayos se tomaron precauciones con el fin de igualar errores experimentales y con ello la posibilidad de hacer comparaciones de los resultados en las mismas con-

diciones, como la de efectuar en la misma tanda todas las pruebas de los componentes y de la mezcla.

Los estudios se centraron, como en todo este trabajo, en la determinación de la fosfatasa alcalina total y en la posición y actividad fosfatásica de las bandas en el gel. El tratamiento ha sido cuantitativo, aplicando criterios de suma actividades fosfatásicas de las bandas en el gel situadas en posiciones análogas en componentes y mezcla. Los valores obtenidos se consideran fiables ya que se apoyan en metodías cuyos coeficientes de variabilidad son inferiores al 2 % (Apartados

En la fosfatasa alcalina de las mezclas de sueros, homogenados y mezclas de ambos, en general, no se cumple el criterio de aditividad. Los valores obtenidos y los esperados mediante cálculo a partir de la F.A. de los componentes raramente coinciden: se producen aumentos o disminuciones según el tipo de mezclas. En forma global, se originan aumentos de la actividad fosfatásica en

- Mezclas de homogenados de órganos entre sí.
- Mezclas de sueros patológicos.

Se produce disminución de la F.A. en

- Mezclas de homogenados y sueros normales.
- Mezclas de homogenados y sueros patológicos.

Estos aumentos o pérdidas de actividad es variable, depende del tipo de mezcla.

Incremento de actividad:

- Máxima, hasta un 80 %, en todas las mezclas de homogenados.

- En mezclas de sueros, si bien la media de los valores hallados es superior a la media de la F.A. calculada, se observan algunos ensayos en donde hay disminución de actividad.

Pérdida de actividad:

- Cuando los homogenados son de riñón o hígado, la pérdida de actividad en la mezcla con sueros normales es máxima, superior al 20 %.
- Si el homogenado es el intestino, prácticamente no hay pérdida de actividad en las mezclas con sueros normales y patológicos. En este caso se cumple el criterio de actividad.

En los ensayos de mezclas con distintas proporciones de los componentes, de homogenados y sueros patológicos, se confirma la pérdida de actividad como era de esperar en este tipo de mezclas sin observarse alguna ley que gobierne estos experimentos al aumentar la proporción de los sueros; los resultados son erráticos. Uno de los propósitos de estos ensayos era la de poner de manifiesto la presencia en el suero de sustancias inhibidoras que justificaran la pérdida de actividad en las mezclas, los resultados obtenidos no parecen indicar tales inhibidores en el suero, o bien que dicha inhibición se produce con cantidades inferiores de suero a las ensayadas. Más adelante se intentará una interpretación de las anteriores anomalías en la F.A. de las mezclas.

En los geles, el comportamiento de los distintos tipos de mezclas es análogo, tanto en la posición de las bandas como en la actividad fosfatásica de las mismas, que se puede resumir en la aparición de bandas en el gel de la mezcla no presentes en los geles de los componentes, así como la situación contraria de no aparición

de la banda, desplazamientos de estas no justificados, anomalías en la actividad fosfatásica de las bandas, etc. es decir, no se cumple el criterio de aditividad en bastantes ocasiones (Apartados 5.2.4; 5.2.5; 5.3.7 y 5.3.8.).

Este comportamiento errático de las fracciones fosfatásicas de homogenados de tejidos y de sueros en las mezclas es difícil de explicar con el concepto aceptado de isoenzimas. Es válido para determinadas enzimas, como por ejemplo la L.D.H., en la que se conoce bastante algunas propiedades de las isoenzimas tales como constitución de las subunidades, combinaciones entre estas, etc. En cambio, en la fosfatasa alcalina sólo ha sido posible aislar y estudiar la fracción placentaria y algunas otras fracciones encontradas en neoplasias y en el intestino de algunos animales.

Esta forma de conducirse las fracciones fosfatásicas hace sugerir la idea de que no se pueden considerar como verdaderas isoenzimas, sino de agrupamientos moleculares de subunidades con una energía de unión pequeña, o sea, se trata de entidades lábiles que en determinadas condiciones se desunen y reagrupan en formas moleculares distintas con actividad y propiedades algo diferentes. Este enfoque de ver las fracciones fosfatásicas se apoya en

- No ha sido posible, hasta la fecha, el aislamiento y análisis de las fracciones fosfatásicas corrientes.
- Numerosos intentos de los investigadores en estudiar esta enzima sin llegar a conclusiones definitivas.
- No cumplirse, en forma generalizada, el criterio de aditividad en la fosfatasa alcalina total tanto en los geles de acrilamida como en mezclas, en las condiciones "in vitro" experimentales.

El anterior punto de vista sobre la estructura y propiedades de las fracciones fosfatásicas ya ha sido señalado por algunos autores. En la revisión de Wilkinson (1971) se encuentra que Moss y King (1962 y 1962a) en estudios sobre la Km en diversos sustratos, llegan a la conclusión de que cada órgano puede elaborar una fosfatasa alcalina única, la cual, puede sufrir a continuación ligeros cambios estructurales para dar múltiples bandas en la electroforesis. Lee (1975) atribuye a reagrupamientos intramoleculares con recombinaciones que dan lugar a diversas bandas en el gel de acrilamida, pérdidas de actividad, etc. cuando los especímenes son congelados y descongelados.

Con el concepto de isoenzimas o fracciones fosfatásicas muy lábiles y reagrupamientos moleculares "in vitro" puede interpretarse gran parte de la problemática de las mezclas, sin embargo, en el caso de mezclas de homogenados entre sí, donde siempre hay un aumento de la actividad enzimática y en mezclas de sueros en que corrientemente también se producen incrementos de actividad, así como el efecto activador de ciertos inhibidores (urea, etc.) en pequeña proporción, resulta insuficiente dicha hipótesis y debe pensarse en otro tipo de mecanismo complementario.

Entre las fracciones fosfatásicas, la intestinal se comporta algo diferente a las restantes: cumple hasta cierto punto el criterio de aditividad, así como presentar una mayor estabilidad al calor, etc.

Identificación de bandas en el gel

Como resultado de los estudios entre los modelos electroforéticos de los geles y sueros patológicos con diagnóstico conocido, de homogenados de órganos, mezclas diversas e inhibidores,

ha sido posible identificar bandas en el espectro del gel correspondientes a fracciones fosfatásicas. Esta identificación debe considerarse desde un punto de vista estadístico, es decir, de mayor frecuencia o probabilidad de que ocurra.

A continuación se indican los argumentos tenidos en cuenta para estas asignaciones:

BANDA CATODICA

Siempre presente en el gel. Se encuentra en el punto de aplicación. Su actividad es variable, desde indicios hasta constituir la banda principal. Se considera como HEPATICA por

- a) En hepatopatías agudas, obstructivas y crónicas es ta banda presenta gran actividad fosfatásica. En ci rrosis biliares obstructivas llega a ser la banda, en algunos casos, superior en intensidad a la anódica.
- b) En homogenados de hígado esta banda es la de mayor actividad en relación con otros órganos.

BANDAS SITUADAS EN LA ZONA DEL 10-40 %

Se consideran HEPATOBILIARES por

- Aparecer en forma relevante en hepatopatías crónicas y hepatopatías con componente obstructivo.

En los modelos electroforéticos produce la impresión de existir mas de una banda hepatobiliar.

BANDAS SITUADAS EN LA ZONA DEL 50-80 % DEL GEL

Se identifican como INTESTINALES debido a

- a) En homogenados de intestino, la mayor actividad se encuentra en la zona considerada.
- b) En ensayos con L-fenilalanina aparece en esta zona la inhibición específica.
- c) En ensayos con neuroaminidasa, la máxima resistencia se encuentra en dicha posición.

En esta zona, parecen haber varias bandas de características semejantes.

BANDA SITUADA EN LA ZONA DEL 80-94 % DEL GEL

Se identifica como OSEA. Prácticamente siempre existe en el gel, bien como una banda netamente separada de la anódica pero muy próxima, o bien como una irregularidad de esta; que en la densitometría aparece como un hombro de dicha banda anódica. La identificación se hace por

- a) Banda destacada en osteopatías que generalmente sobrepasa a la banda anódica.
- b) Banda destacada en niños en crecimiento.
- c) Banda preponderante en tumores con metastasis óseas.
- d) Banda muy nítida en homogenados de hueso.
- e) Banda resistente a la inhibición con l-fenilalanina y con muy poca resistencia al calor.

BANDA ANODICA

Es una banda siempre presente en el gel que corresponde a la fracción de mayor movilidad electroforética. Se considera HEPATICA de acuerdo a lo aceptado por la mayoría de los investigadores y en el caso particular de este trabajo por presentar dicha banda una gran actividad en sueros patológicos con trastornos hepáticos.

En ensayos con inhibidores se producen desdoblamientos que sugieren estar constituida por varias fracciones.

TRABAJOS QUE PUEDEN DESARROLLARSE COMO CONTINUACION A ESTA MEMORIA

- Estudio de porosidades y otras condiciones experimentales del gel y de la electroforesis, con objeto de una mayor resolución de bandas en la zona anódica.
- Ensayos conducentes a un aumento de la longitud del gel con el fin de mantener la banda de albúmina en el mismo, sin pérdida de resolución de las bandas fosfatásicas, y que dicha banda sirva como punto de referencia posicional de bandas.
- Ampliar el estudio de sueros normales y su relación genética.
- Intentar, en homogenados de órganos, extracciones y purificaciones de fosfatasa alcalinas.
- Un estudio más completo con sueros patológicos para la obtención de modelos en toda clase de trastornos, donde la fosfatasa alcalina se encuentre elevada.
- Búsqueda de fracciones fosfatásicas anómalas, como las procedentes de neoplasias.

- Estudio en profundidad sobre inhibiciones con la técnica propuesta y sus modificaciones posteriores, con enfoque especial sobre estabilidad de las fracciones
- Estudio más completo sobre mezclas de los diversos tejidos con actividad fosfatásica, insistiendo en la problemática del cumplimiento del criterio de aditividad.

VII. Conclusiones

CONCLUSIONES

- 1.- Se propone un procedimiento de separación electroforética, en gel de poliacrilamida, de las fracciones de la fosfatasa alcalina que presenta ventajas con respecto a otras técnicas descritas, como la de revelar un elevado número de bandas con buena resolución y nitidez.
- 2.- El gel consta de tres diferentes porosidades que corresponden al 4,7 y 9 %, de acuerdo a las normas utilizadas para geles de acrilamida; los bufferes son de 10,6 para el gel y 8,5 de pH para el electrolito, que permiten efectuar la electroforesis entre 25 y 30 minutos, tiempo muy inferior a otras técnicas. La estabilidad de las bandas obtenidas en el gel es alta lo que hace posible repetir lecturas densitométricas aún después de varios meses.
- 3.- La metodología es fiable. Los coeficientes de variabilidad obtenidos respecto a reproductibilidad y precisión no alcanzan el 2 % que deben considerarse como muy buenos, lo que garantizan resultados aceptables y susceptibles de un tratamiento cuantitativo.
- 4.- Para el estudio posicional de las bandas en el gel se han normalizado éstas en forma porcentual, considerando como punto cero la banda situada en la estrecha zona de aplicación del suero y como cien el pico de la banda de mayor movilidad electroforética, en la región anódica. Con la posición de cada banda intermedia en relación al recorrido de la banda anódica, unido a la actividad fosfatásica de la misma expresada como fracción porcentual del área densitométrica, se ha confeccionado los mapas de cada ensayo que figuran en los protocolos. para apreciar diferencias posicionales se ha establecido el intervalo del 4 %.

- 5.- Con la metodología anteriormente indicada, se ha realizado un estudio con sueros de personas supuestamente normales, que comprende 525 casos, en los que la fosfatasa alcalina era inferior a 50 U.I.. En cada suero se determina la fosfatasa alcalina total, y, en el gel, el número de bandas que origina, posiciones y actividad fosfatásica de las mismas.
- 6.- El número de bandas obtenidas en el gel, en los sueros normales, oscila entre 2 y 8, siendo los geles con dos bandas los de mayor frecuencia, disminuyendo ésta al aumentar el número de bandas. Esta distribución de frecuencias decreciente del número de bandas se ajusta a una ecuación de 2º grado con alto coeficiente de correlación.
- 7.- Con las posiciones de las bandas en el gel se ha elaborado una distribución de frecuencias y gráficos correspondientes con el propósito de que sirvan de modelos de comparación a sueros patológicos con posibilidades de aplicación en clínica. Se han confeccionado modelos de 3,4,5, 6 y 7 bandas. En estos modelos, aparecen las bandas en el gel en los lugares de máxima probabilidad.
- 8.- Sobre el modelo anterior de frecuencias, a cada banda, se le asigna el valor medio de la actividad fosfatásica de esa frequencia, dando lugar a otro tipo de modelo para la actividad fosfatásica del gel.
- 9.- Las bandas intermedias en el gel se sitúan en determinando lugares preferenciales. La máxima probabilidad de encontrar una banda se halla en las proximidades de la banda anódica. Con una frecuencia menor aparecen bandas en la zona del 50-60 % del recorrido de la banda anódica y con una frecuencia aún menor se encuentran bandas en la región del 10-40 %. Los modelos electroforéticos con 2,3,4 y 5 bandas se pueden considerar reg

representativos de los sueros normales, los cuales, constituyen el 95 % de la casuística.

- 10.-Se observa, en general, una gran dispersión de valores en la actividad fosfatásica de las bandas de los sueros normales. Se exceptúa la banda catódica, cuya variabilidad es pequeña y que contiene el 7-8 % de la actividad fosfatásica del suero. La mayor actividad fosfatásica se encuentra en la banda anódica y bandas adyacentes. Las bandas situadas en la zona del 50-80 % del gel contienen sólo el 10 % de actividad y en menor cuantía aún en las bandas posicionadas en la región del 10 al 40 %.
- 11.-Se ha estudiado, en los sueros normales, la influencia del sexo en las distribuciones de posiciones de bandas y actividad fosfatásica en los geles, aplicándose criterios estadísticos para valorar los resultados. Se encuentran diferencias al considerar el sexo respecto al número de bandas y posición preferencial de las mismas. No se observan diferencias en la distribución de la actividad fosfatásica.
- 12.-Así mismo se ha estudiado la influencia de la edad. En contrándose que la fosfatasa alcalina total aumenta progresivamente con la edad. En sujetos de 30 a 40 años y en adelante, aumenta la incidencia de encontrar bandas en las zonas del 10-40 % y en la del 50-80 % que corresponden a bandas hepatobiliares e intestinales.
- 13.-También se ha estudiado, en sueros normales, la influencia de los grupos sanguíneos. Se ha aplicado el criterio del "t" de Studen"t" a los valores medios de la fosfatasa alcalina total de cada grupo, encontrándose que existen diferencias significativas al 95 % de probabilidad entre varias de los 12 grupos;

siendo la diferencia más marcada entre los grupos O y B por una parte y, A_1B y A_2B por la otra. El factor Rh, a la anterior probabilidad, no son significativas las diferencias.

- 14.-Existe dependencia entre el número de bandas en el gel y los grupos sanguíneos, de acuerdo a la prueba del χ^2 y probabilidad del 95 %. Los grupos sanguíneos O y B producen un número superior de bandas en el gel que otros grupos, hecho informado cualitativamente por algunos autores. Los modelos posicionales y de actividad fosfatásica de las bandas, presentan algunas diferencias entre los grupos sanguíneos.
- 15.-Se estudian los homogenados de los órganos hígado, hueso, riñón e intestino, como fuentes de fosfatasa alcalina. Los órganos proceden de biopsias y necropsias. Se encuentra una gran dispersión de valores en la fosfatasa alcalina de cada órgano, independientemente de su procedencia. El número de bandas en el gel, a diferencia de los sueros normales, oscila entre tres y cinco. Los modelos electroforéticos difieren de unos órganos a otros encontrándose presentes, sin embargo, casi todas las fracciones si bien en distintas proporciones.
- 16.-Se hace un estudio de sueros patológicos con esta técnica, y que comprende inicialmente 408 casos. Se han considerado afecciones que cursan con fosfatasemias elevadas como hepatopatías, osteopatías, nefropatías, enfermedades respiratorias y pancreáticas y neoplasias. Un grupo aparte lo forman niños y embarazadas. Análogamente a los sueros normales y homogenados de órganos, se examinan la fosfatasa alcalina total, número de bandas en el gel, así como la frecuencia y actividad fosfatásica de dichas bandas en las zonas del gel.
- 17.-En sueros patológicos raramente aparecen sólo dos bandas en el

gel, lo corriente es que el número de bandas sea de 3 a 5. Por otra parte, se ha encontrado que sueros con una fosfa tasa alcalina alta originan numerosas bandas en el gel. Am bas observaciones constituyen un dato de interés.

- 18.-Dentro de cada tipo de enfermedades, se han agrupado afec ciones con alguna afinidad con la finalidad de facilitar su estudio y aumento de casuística. Los modelos de frecuencias de bandas obtenidos así como los de distribución de la acti vidad fosfatásica en el gel, que figuran en esta memoria, varían de unas enfermedades a otras y pueden ser útiles para ayudar al diagnóstico en clínica. En muchas ocasiones, se jus tifican e interpretan la presencia de las bandas e intensidad de las mismas en el gel, como consecuencia de trastornos en los órganos afectados.
- 19.-Se han realizado ensayos con los inhibidores L-fenilalanina, estabilidad a la temperatura, urea, EDTA y neuroaminidasa. Ex cepto esta última en que la inhibición se ha efectuado en el suero u homogenado, los demás inhibidores se han ensayado en el mismo gel después de la separación electroforética y comparandose los espectros con geles sin inhibidores, lo que se considera un proceder ventajoso. Los inhibidores ensayados pertenecen a dos tipos principales, acción del calor y agentes químicos. El primero mide la estabilidad física de la estruc tura de la enzima, mientras que el segundo grupo la acción es de carácter fisicoquímico afectando esencialmente a los centros ac tivos. Los resultados obtenidos concuerdan en gran parte con los hallados en la literatura. En general, se ha encontrado que estos ensayos con inhibidores proporciona una información poco valiosa para la identificación de las bandas, ya que estos in hibidores no son específicos siendo su acción de distinta in tensidad en cada fracción, y por otra parte se ha observado que

algunos inhibidores a bajas concentraciones, producen exaltación en la actividad fosfatásica, así mismo, con distinta magnitud en las diversas fracciones.

- 20.-Se ha tratado el problema de mezclas de sueros, de homogenados y de ambos, con varios planteamientos y en forma cuantitativa, apoyándose en la fiabilidad de las determinaciones analíticas. En general, no se cumple el criterio de aditividad. La fosfatasa alcalina total experimenta un aumento cuando se mezclan tanto los homogenados como los sueros entre sí; por el contrario, las mezclas de sueros con órganos producen globalmente pérdida de actividad. Se exceptúa de este comportamiento cuando intervienen los homogenados de intestino en los que prácticamente se cumple el criterio de aditividad.
- 21.-En los geles, los distintos tipos de mezclas, tampoco se cumple el criterio de aditividad en muchos casos, tanto en la posición de las bandas como en la distribución de la actividad fosfatásica. Aparecen bandas en la mezcla inexistentes en los componentes, desplazamientos de bandas e incluso desapariciones, anomalías en las actividades de las bandas, etc.
- 22.-Este comportamiento errático de las fracciones fosfatásicas hace sugerir la idea de que no se pueden considerar "in vitro" como verdaderas isoenzimas, de acuerdo con las definiciones en uso, sino de agrupamientos moleculares de subunidades con una energía de unión pequeña, es decir, muy lábiles, que en determinadas condiciones se desunen y reagrupan en formas moleculares distintas con actividad y propiedades algo diferentes. Lo anterior puede explicar la conducta de las mezclas, los fallidos intentos de aislar y analizar las fracciones fosfatásicas corrientes, los numerosos intentos de los investigadores en estudiar esta enzima sin llegar a conclusiones definitivas, etc.

23.-Como resultado de los estudios entre los modelos electroforéticos de los geles de sueros patológicos, de homogenados de órganos, mezclas diversas, ensayos con inhibidores y desde el punto de vista estadístico han sido identificadas bandas en el gel para esta metódica. La banda catódica, situada en el punto de aplicación de los sueros, se considera hepática. Las bandas situadas en la zona del 10-40 % del recorrido de la banda de mayor movilidad, se consideran como hepatobiliares. Las bandas situadas en la zona del 50-80 % del gel, se identifican como intestinales. Las bandas situadas en la zona del 80-94 % del gel, se identifican como óseas. La banda anódica, siempre presente y de mayor movilidad se consideran hepáticas.

24.-Finalmente, se indican posibles trabajos para completar esta memoria.

VIII. Bibliografia

B I B L I O G R A F I A
=====

- AALUND, O., RENDEL, J. and FREEDLAND, R.A.
Isolation and characterization of ovine serum alkaline phosphatases.
Biochimica et Biophysica Acta, 110, 113-123 (1965)
- AGUS, S.G., COX, R.P. and GRIFFIN, M.J.
Inhibition of alkaline Phosphatase by Cysteine and its Analogues.
Biochimica et Biophysica Acta, 118, 363-370 (1966)
- AHMED, Z., ABUL-FADL, M.A. and KING, E.J.
The co-enzyme factor of alkaline phosphatase.
Biochimica et Biophysica Acta, 36, 228-240 (1959)
- AHMED, Z. and KING, E.J.
Purification of placental alkaline phosphatase.
Biochimica et Biophysica Acta, 40, 320-328 (1960)
- AHMED, Z. and KING, J.E.
Kinetics of placental alkaline phosphatase.
Biochimica et Biophysica Acta, 45, 581-592 (1960)
- AIDA SOTO, Ph.D.
Alkaline phosphatase, isoenzymes.
Publicación de DADE Div. Amer. Hosp. Supply Corp.,
Miami, Florida 1972.
- AISENBERG, A.C., KAPLAN, M.M., RIEDER, S.V. and GOLDMAN, J.M.
Serum alkaline phosphatase at the onset of Hodgkin's disease.
Cancer, 26, 313, (1970)
- AKAMATSU, S. and KOBAYASHI, K.
Chemical nature of the co-phosphomonoesterase.
Enzymologia, 15, 154-157 (1951)
- AL-SARRAF, M.
Primary liver cancer. A review of the clinical features, blood groups, serum enzymes, therapy and survival of 65 cases.
Cancer, 33, 574 (1974)

- ANAGNOSTOPOULOS, C.
Action comparée de quelques réactifs des fonctions amines
sur diverses phosphatases acides et alcalines.
Biochimica et Biophysique Acta, 4, 584-595 (1950)
- ANAGNOSTOPOULOS, C. and MATSUDAIRA, H.
Purification and kinetic studies of the alkaline phosphatase of human placenta.
Proc. Intern. Symp. Enzyme Chem., Tokyo Kyoto, 1957,
(K. Ichihara, ed.), p. 166. Maruzen, Tokyo, 1958.
- ANDERSON, W.A.D.
Pathology, vol. 1, 530-538, 564-565.
The Mosby Company, St. Louis, 1971
- ANIDO, M.D.
Enzimología: Aplicaciones diagnósticas.
Publicación mecanografiada. Lab DADE. Madrid, 1973
- ARFORS, K.E., BECKMAN, L. and LUNDIN, L.G.
Further studies on the association between human serum phosphatases and blood groups.
Acta Genet. (Statist, Med). 13, 366-368 (1963)
- ARION, E.J. and NORDLIE, R.C.
Liver microsomal glucosa-6-phosphatase, inorganic pyrophosphatase, and pyrophosphatase-glucose-phosphotransferase. II. Kinetic studies.
J. Biol. Chem., 239, 2752-2757 (1964)
- ARMSTRONG, A.R. and BANTING, F.G.
The site of formation of the phosphatase of serum.
Canad. Med. Ass. J., 33, 243, (1935)
- ARMSTRON, A.R., KING, E.J. and HARRIS, R.I.
Phosphatase in Obstructive Jaundice.
Cand. M.A.J., 31, 14 (1934)
- BARH, M. and WILKINSON, J.H.
Urea as a selective inhibitor of human tissue alkaline phosphatase.
Clin. Chim. Acta., 17, 367 (1967)
- BAKER, R.W.R. and PELLEGRINO, C.
The separation and detection of serum enzymes by paper electrophoresis.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 6, 94-101 (1954)

- BAMFORD, K.F., HARRIS, J., LUFFMAN, J.E., BABSON, E.B. and CLEGHORN, T.E.
Serum alkaline phosphatase and the ABO blood groups.
Lancet. 530-531 (1965)
- BARRON, E.S.G. and SINGER, T.P.
Studies on biological oxidations. XIX. Sulfhydryl enzymes in carbohydrate metabolims.
J. Biol. Chem., 157, 221-240 (1945)
- BARUCH, J. DAVIS
Disc Electrophoresis. 11. Method and application to human serum proteins. 404-427 (1964)
- BECKER, K.L. and STAUFFER, M.H.
Evaluation of concentrations of serum alkaline phosphatase in hepatitis and obstructive jaundice.
Am. J. Med. Sci., 243, 222-227 (1962)
- BECKMAN, L.
Associations between human serum alkaline phosphatase and blood groups.
Acta Genet. Statist Med., 14, 286-297 (1964)
- BELFANTI, S., CONTARDI, A. and ERCOLI, A.
Researches on the phosphatases. 11. Inactivation and reactivation of the phosphatases of animal organs.
Biochem. J., 29, 842-846 (1935)
- BELLE, H. van
Kinetics and inhibition of alkaline phosphatases from canine tissues.
Biochimica et Biophysica Acta, 289, 158-168 (1972)
- BELLE, H. van
Alkaline phosphatase. I. Kinetics and inhibition by levamisole of purified Isoenzymes from Humans.
Clin. Chem., 22/7, 972-976 (1976)
- BENDER, M.L. and NAKAMARA, K.
The effect of structure on the rates of some α -chymotrypsin-catalysed reactions.
J. Am. Chem. Soc., 84, 2577-2582 (1962)
- BENNETT, M. SHAPIRO and STADTMAN, E.R.
Glutamine syntetase deadenylylating enzyme.
Biochemical and biophysical research communications, 30, 1, 32-37 (1968)

- BERGERMAN, J. and BLETHEN, S.
Determination of alkaline phosphatase isoenzymes.
Clin. Chim. Acta, 36, 389 (1972)
- BESSEY, O.A., LOWRY, O.H. and BROCK, M.
A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum.
J. Biol. Chem., 164, 321-329 (1946)
- BINKLEY, F.
Comparison of the alkaline phosphatases of E. Coli and renal tissue.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 6, 67-70 (1961)
- BIRKETT DONALD, J., DONE, J. and NEALE, F.C.
Serum alkaline phosphatase in pregnancy: and immunological study.
Brit. Med. J., 1, 1210-1212 (1966)
- BIRKETT, D.J., CONYERS, R.A.J., NEALE, F.C., POSEN, S. and BRADNELL-WOODS, J.
Action of urea on human alkaline phosphatase: with a description of some automated techniques for the study of enzyme kinetics.
Archs. Biochem. Biophys., 121, 470-479 (1967)
- BISERTE, G.
Donnees structurales sur les isoenzymes de la lactico deshydrogenase.
Path. Biol., 5-6, 261 (1970)
- BODANSKY, A.
Phosphatase studies. I. Determination of inorganic phosphate, Beer's Law and interfering substances in the Kuttner-Lichtenstein Method.
J. Biol. Chem., 99, 197-206 (1932)
- BODANSKY, A.
Phosphatase studies. II. Determination of serum phosphatase factors influencing the accuracy of the determination.
J. Biol. Chem., 101, 93-104 (1933)
- BODANSKY, O.
Are the phosphatases of bone, kidney, intestine and serum identical? The use of bile acids in their differentiation.
J. Biol. Chem., 118, 341-362 (1937)

- BODANSKY, O.
The inhibitory effects of dl-alcaline, l-glutamic acid, l-lysine and l-histidine on the activity of intestinal, bone and kidney phosphatases.
J. Biol. Chem., 174, 465-476 (1948)
- BODANSKY, O.
Influence of magnesium and cobalt on inhibition of phosphatases of bone, intestine and osteogenic sarcoma by amino acids.
J. Biol. Chem., 179, 81-102 (1949)
- BODANSKY, O. and SEHWARTZ, M.K.
Comparative effects of α -histidine on the activities of S'-nucleotidase and alkaline phosphatase.
J. Biol. Chem., 238, 3420-3427 (1963)
- BOERNIG, H.
Studies on Alkaline Phosphatase in Liver and Intestine after Bile Duct Ligation.
Enzymes and Isoenzymes, vol. 18, 341-345, 1970. Edited by D. Shugar. Academic Press
- BORRONE LEFEBVRE, E.M.D., ROBERT, G., HAINING, M.D. and ROBERT F. LABBE, Ph.D.
Coarse facies, Calvarial thickening and hiperphosphatasia associated with long-term anticonvulsant therapy.
The New England Journal of Medicine, vol. 286, n° 24, 1301-1302, 1972
- BOTEY, A., MATAMOROS, N. y REVERT, C.
Termolabilidad de la fosfatasa alcalina en pacientes en hemodialisis.
Revista Clínica Española. Tomo 138, Núm. 2, 155-161, 1975
- BOYER SAMUEL, H.
Alkaline Phosphatase in Human sera and placentae.
Science, 134, 1002-1004 (1961)
- BOYER, S.H.
Human organ alkaline phosphatases. Discrimination by several means including starch gel electrophoresis of anti-enzyme-enzyme supernatant fluids.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 103, 938-955 (1963)
- BRANDAU, H.
Vigilancia endocrinológica y enzimológica del embarazo.
Med. Klin. 179, 27-38 (1976)

- BRESTKIN, A.P. and RZHEKHINA, N.I.
On the effect of concentration and nature of the buffer solution upon the catalytic properties of alkaline phosphatase.
Biokhimiya, 30, 471-476 (1965)
- BROHULT, J. and SUNDBLAD, L.
Isoenzyme Patterns of Serum Alkaline Phosphatase in ethanol - induced Liver Injury.
Acta Med. Scand., 194, 497-499 (1973)
- BRUNEL, C. and CATHALA, G.
Imidazole: an inhibitor of L-phenylalanine-insensitive alkaline phosphatases of tissue other than intestine and placenta.
Biochim. Biophys. Acta, 268, 415-421 (1972)
- BUICE, T.C., FIFE, T.H., BRUNO, J.J. and BRANDON, N.E.
Hydroxyl group catalysis. II. The reactivity of the hydroxyl group of serine. The nucleophilicity of alcohols and the case of hydrolysis of their esters as related to their PK's.
Biochemistry, 1, 7-12 (1962)
- BURGEN, A.S.V.
Urinary excretion of phosphatase in man.
Lancet, 252, 329-331 (1947)
- BURLINA, A., BUGIARDINI, R. and GALZIGNA, L.
Diagnostic usefulness of alkaline phosphatase isoenzyme determination.
6° simposio internazionale di enzimologia clinica. Celebrato in Venezia in October 1974. Publicado por A. Burlina en 1976
- BURLINA, A. and BUGIARDINI, R.
Studies on alkaline phosphatase isoenzymes in hepatic diseases. Relation to γ -glutamyltransferase.
Clinica Chimica Acta, 85, 49-54 (1978)
- BUSSELL, N.E., VOGEL, J.J. and LEVY, B.M.
Magnesium deficiency. II. Isoenzymes of serum alkaline phosphatase in acute magnesium deficiency.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 145, 574 (1974)
- BUTTERWORTH, P.J. and MOSS, D.W.
Starch-gel electrophoresis of urinary alkaline phosphatase.
Biochem. J., 88, 19P-20P (1963)

- BUTTERWORTH, P.J., MOSS, D.W., PITKANEN, E. and PRINGLL, A.
Patterns of urinary excretion of alkaline phosphatase in acute renal failure.
Clin. Chim. Acta, 11, 212-219 (1965)
- BUTTERWORTH, P.J. and MOSS, D.W.
Action of Neuraminidase on Human Kidney Alkaline Phosphatase.
Nature, 209, 805-806 (1966)
- BUTTERWORTH, P.J. and MOSS, D.W.
The effect of urea on human alkaline phosphatase preparations.
Enzimologia, 32, 269-277 (1967)
- BUTTERWORTH, P.J.
The pyrophosphatase activity of pig Kidney alkaline phosphatase and its inhibition by magnesium ions and excess of pyrophosphate.
Biochem. J., 110, 671-675 (1968)
- CADEAU, B.J. and MALKIN, A.
A relative heat stability test for the identification of serum alkaline phosphatase isoenzymes.
Clin. Chim. Acta, 45, 235-242 (1973)
- CALDWELL, J.H.
Serum alkaline phosphatase (intestinal) after acute mesenteric infarction.
Gastroenterology, 66, 670 (1974)
- CANALCO
QDA Specific reagent kit instructions for quick disc electrophoresis of alkaline phosphatase isozymes.
Maryland 1970
- CANTAROW, A. and SEHEPARTZ, B.
Bioquímica 4ª edición.
Editorial Interamericana, S.A., pág. 212, 1969
- CAPETTA, P., ANTIFORA, E. and POLVANI, F.
Serum Enzymes of Placental Origin in Normal and Abnormal Pregnancy.
6° Simposio Internazionale di Enzimologia Clinica 271-278
Publicado por A. Burlina, 1976
- CAPLOW, M. and JENCKS, W.P.
The effect of substituents on the deacylation of benzoylchymotrypsins.
Biochemistry, 1, 883-893 (1962)

- CARLSTEN, A., EDLUND, Y. and THULESIUS, O.
Bilirubin, alkaline phosphatase and transaminases in blood and lymph during biliary obstruction in the cat.
Acta Physiol. Scand., 53, 58-67 (1961)
- CARRERAS
Comunicación, presentada en el I Congreso Nacional de la Sociedad Española de Química Clínica.
Celebrado en noviembre de 1978 en Barcelona
- CLOETENS, R.
Identification de deux phosphatases alcalines dans les organes animaux.
Enzimologia, 6, 46-56 (1939)
- CLUBB JOHN, S., NEALE, F.C. and POSEN, S.
The behavior of infused human placental alkaline phosphatase in human subjects.
J. Lab. Clin. Med., 66, n° 3, 493-507 (1965)
- COHN, E.J. and EDSALL, J.T.
Proteins, Amino Acids and Peptides.
p. 445, Reinhold, New York, 1943
- COHN, M.
Mechanisms of clearance of glucose-1-phosphate.
J. Biol. Chem., 180, 771-781 (1949)
- COMPTON, J.A., GRIEP, J.A. and BOUDERMAN, D.P.
Evaluation of some Alkaline Phosphatase Isozymes for use in Reference Sera.
Clin. Biochem., 7, 212-222 (1974)
- COOKE, K.B. and SILVA, J.F.
Serum alkaline phosphatase fractionation as an aid to diagnosis.
J. Clin. Pathol., 14, 500-501 (1961)
- CROFTON, P.M. and SMITH, A.F.
Regan variant alkaline phosphatase in gastrointestinal carcinoma.
Clinica Chimica Acta, 86, 81-88 (1978)
- CUNNINGHAM, L.W.
Proposed mechanism of action of hydrolytic enzymes.
Science, 125, 1145-1146 (1957)
- CURZEN, P. and MORRIS, I.
Heat-stable alkaline phosphatase in maternal serum.
J. Obstet. Gynaec. Br. Commonw., 75, 151-157 (1968)

- CHAPPELET-TORDO, D., FOSSET, M., IWATSUBO, M., GACHE, C. and LAZDUNSKI, M.
Intestinal alkaline phosphatase. Catalytic properties and half of the sites reactivity.
Biochemistry, 13, 1788-1797 (1974)
- CHEN, S. and ANDERSON, W.
Alkaline phosphatase isoenzymes in hepatobiliary diseases.
Gastroenterology, 62, 731 (1972)
- CHEN, S., ANDERSON, S.W. and JONES, J.E.
Alkaline phosphatase isoenzyme in hepatobiliary diseases and hyperthyroidism.
Pahlavi med. J., 4, 357-365 (1973)
- CHEN, S.T.
Alkaline Phosphatase.
Front gastrointes. Res., vol. 2 pp. 109-149. Ed. Leo van der Reis, Karger, Basel 1976
- CHIANDUSSI, L., GREENE, S.F. and SHERLOCK, S.
Serum alkaline phosphatase fractions in hepatobiliary and bone diseases.
Clin. Sci., 22, 425-434 (1962)
- CHUNG-JA MO CHA, BALDUINO MASTROFRANCESCO, SUNGMANCHA and RANDALL, Henry T.
Electrophoretic patterns of alkaline phosphatase isoenzymes in human sera with abnormally high activity, and an unusual band observed in sera of patients with pancreatic cancer.
Clin. Chem., 21/8, 1067-1071 (1975)
- DABICH, D. and NEUHAS, O.W.
Purification and properties of bovine synovial fluid alkaline phosphatase.
J. Biol. Chem., 241, 415-420 (1966)
- DALE, G. and LATNER, A.L.
Isoelectric focusing of serum proteins in acrylamide gels followed by electrophoresis.
Clin. Chim. Acta, 24, 61-75 (1969)
- DALGAARD, J.B.
On the cause of increase in serum phosphatase in obstructive jaundice.
Acta Physiol. Scand., 22, 200-210 (1951)

- DAYAN, J. and WILSON, I.B.
The phosphorylation of Tris by alkali phosphatase.
Biochim. Biophys. Acta, 81, 620-623 (1964)
- DEITRICH, R.A., HELLERMAN, L. and WEIN, J.
Diphosphopyridine nucleotidelinked aldehyde dehydrogenase.
I. Specificity and Sigma-Rhogunction.
J. Biol. Chem., 237, 560-564 (1962)
- DENT, C.E. and HARPER, C.M.
Plasma alkaline phosphatase in normal adulte and in patients with primary hyperparathyroidism.
Lancet, 559-563 (1962)
- DIJKMAN, J.H. and KLOPPENBORG, P.W.C.
Increased serum alkaline phosphatase activity in pulmonary infarction.
Acta Med. Scand., 180, 273-281 (1966)
- DINGJAN, P.G., JONGENEEL, J., POSTMA, T. and STROES, J.A.P.
Evaluation of the determination of alanine naphthylamidase isoenzymes by agar and polyacrylamide disc electrophoresis for the diagnosis of pancreatic diseases.
Clinica Chimica Acta, 49, 215-224 (1973)
- DINGJAN, P.G., POSTMA, T. and STROES, J.A.P.
Quantitative Differentiation of Human Serum Alkaline phosphatase Isoenzymes with Poliacrylamide Disc Gel Electrophoresis.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem., 11, 4, 167-171 (1973)
- DOOSE, H.
Studies uber die alkalische serum phosphatase der Ratte.
D. Mitteilung: Das Verhalten der alkalischen serumphosphatase der rachitischen ratte unter vitamin D.
Z. Exptl. Med., 134, 73-81 (1960)
- DRILL, V.A. and RIGGS, D.S.
Inhibition of alkaline serum phosphatase activity during liver disease.
J. Biol. Chem., 162, 21-25 (1946)
- DRYER, R., TAMMES, A. and ROUTH, J.
The determination of phosphorus and phosphatase with N-phenyl-p-phenylenediamine.
J. Biol. Chem., 225, 177-183 (1957)

- DYMLING, J.F.
Separation of serum and placental alkaline phosphatase by agarose gel electrophoresis and sephadex chromatography. *Scandinav. J. Clin. Lab. Investigation*, 18, 129-133 (1966)
- EATON, R.H. and MOSS, D.W.
Partial purification and some properties of human bone alkaline phosphatase. *Enzymologia*, 35, 31-39 (1968)
- EMMELOT, P. and BOS, J.C.
On the participation of neuraminidase - sensitive sialic acid in the K^+ -dependent Phosphohydrolysis of p-nitrophenyl phosphate by isolated rat-liver plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 115, 244-247 (1966)
- ENGSTROM, L.
Studies on calf intestinal alkaline phosphatase. I. Chromatographic purification, microheterogeneity and some other properties of the purified enzyme. *Biochim. Biophys. Acta*, 52, 36-48 (1961)
- ENGSTROM, L.
Incorporation of inorganic phosphate into alkaline phosphatase from *E. coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 52, 606-609 (1962)
- ENGSTROM, L.
The amino acid sequence around the reactive serine in calf intestinal alkaline phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*, 92, 71-78 (1964)
- ESBRIT, P., RAPADO, A. y CASTRO MENDOZA, H.J.
Isoenzimas de fosfatasa alcalina: Aspectos bioquímicos y clínicos. *Revista clínica española*, Tomo 137, Núm. 3, 1975
- FERNLEY, H.N. and WALKER, P.G.
Kinetic behavior of calf-intestinal alkaline phosphatase with 4-methylumbelliferyl phosphate. *Biochem. J.*, 97, 95-103 (1965)
- FERNLEY, H.N. and WALKER, P.G.
Inhibition of alkaline phosphatase by L-phenylalanine. *Biochem. J.*, 116, 543-544 (1970)
- FERNLEY, H.N.
Mammalian alkaline phosphatases. The enzymes 3rd ed. (P.D. Boyer ed. Academic Press) Vol. IV. cap. 13, 417-447 New York, 1971

- FISHMAN, W.H., -GREEN, S. and INGLIS, N.I.
Organ-specific behavior exhibited by rat intestine and liver alkaline phosphatase.
Biochim. Biophys. Acta, 62, 363-375 (1962)
- FISHMAN, W.H., GREEN, S. and INGLIS, N.I.
L-Phenylalanine: an Organ Specific, Stereospecific Inhibitor of Human Intestinal Alkaline Phosphatase.
Nature, 18, 685-686 (1963)
- FISHMAN, W.H. and GHOSH, N.K.
Isoenzymes of human alkaline phosphatase.
Adv. in Clin. Chem., 10, 255-370 (1967)
- FISHMAN, W.H., INGLIS, N., STOLBACH, L.L. and KRANT, M.J.
Immunology and biochemistry of Regan isoenzyme of alkaline phosphatase in human cancer.
Nature, Lond., 219, 697-699 (1968)
- FISHMAN LILLIAN

Acrylamide Disc Gel Electrophoresis of Alkaline Phosphatase of Human Tissues, Serum and Ascites Fluid Using Triton X - 100 in the Sample and the Gel Matrix.
Biochemical Medicine, 309-315 (1974)
- FISKE, C.H. and SUBBAROW, Y.
The colorimetric determination of phosphatase.
J. Biol. Chem., 66, 375-400 (1925)
- FOLIN, O. and CIOCALTEU, V.
On tyrosine and tryptophan determination in proteins.
J. Biol. Chem., 73, 627-650 (1929)
- FONTING, S.
Elevation of serum alkaline phosphatase in severe pyclo-nephritis and obstructive nephropathy.
Wephron, 12, 197 (1974)
- FRAENKEL-CONRAT, H. and OLCOTT, H.S.
Reaction of formaldehyde with proteins. VI. Cross-linking of amino groups with phenol, imidazole or indole groups.
J. Biol. Chem., 174, 827-843 (1948)
- FRAENKEL-CONRAT, H.
Methods for investigating the essential groups for enzyme activity.
Methods Enzymol., 4, 256-259 and 263 (1957)

- FRITSCH, H.A. Jr., and ADAMS-PARCK, H.R.
High molecular-weight isoenzymes of alkaline phosphatase in human serum. Demonstration by cellulose acetate electrophoresis and physico chemical characterization.
Clin. Chim. Acta, 52, 81 (1974)
- GHOSH, N.K., INGLIS, N.I. and FISHMAN, W.H.
Properties of purified and crystalline human placental alkaline phosphatase.
Abstr. Papers, 152 nd Meeting.
Am. Chem. Soc., New York, p. 281c (1966)
- GHOSH, N.K., GOLDMAN, S.S. and FISHMAN, W.H.
Human placental alkaline phosphatase a sialo protein.
Enzymologia, 33, 113-124 (1967)
- GHOSH, N.K. and FISHMAN, W.H.
Purification and properties of molecular-weight variants of human placental alkaline phosphatase.
Biochem. J. 108, 779-792 (1968)
- GHOSH, N.K. and FISHMAN, W.H.
On the mechanism of inhibition of intestinal alkaline phosphatase by L-phenylalanine. 1. Kinetic studies.
J. Biol. Chem., 241, 2516-2522 (1969)
- GOULD, B.S.
The action of "alkaline" phosphatase.
J. Biol. Chem., 156, 365-371 (1944)
- GREENBERG, L.J.
Fluorometric measurement of alkaline phosphatase and amino peptidase activities in the order of 10^{-14} mole.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 9, 430-435 (1962)
- GUTMAN, A.B.
Serum alkaline phosphatase activity in diseases of the skeletal and hepatobiliary systems.
Am. J. Med., 27, 875-901 (1959)
- HAFKENSCHIED, J.C.M. and JANSEN, A.P.
Standardization of the Alkaline Phosphatase Determination with Human Placental Phosphatase.
Clin. Chim. Acta, 59, 63-69 (1975)
- HAIJE, W.H. and DeJONG, M.
Iso-enzyme patterns of serum alkaline phosphatase in agar-gel electrophoresis and their clinical significance.
Clin. Chim. Acta, 8, 620-623 (1963)

- HALL, A.N., HOLLINGSHEAD, S. and RYDAN, H.N.
The influence of structure on the hydrolysis of substituted phenyl- α -D-glucosides by α -glucosidase.
Biochem. J., 84, 390-394 (1962)
- HALL, G.H.
Glant-cell arteritis and raised serum alkaline phosphatase levels.
Lancet, 2, 48 (1973)
- HAMMETT, L.P.
"Physical Organic Chemistry". p. 184, McGraw-Hill, New York, 1940
- HARKNESS, D.R.
Studies on human placental alkaline phosphatase. 1. Purification and crystallization.
Arch. Biochem. Biophys., 126, 503-512 (1968)
- HEALY, P.J.
Quantitative analysis of serum alkaline phosphatase isoenzyme activity.
Clin. Chim. Acta, 55, 407-409 (1974)
- HODSON, A.W., LATNER, A.L. and RAINE, L.
Isoenzymes of alkaline phosphatase.
Clin. Chim. Acta, 7, 255-261 (1962)
- HODSON, A.W. and LATNER, A.L.
Alkaline phosphatase isoenzymes of human kidney and urine.
Clin. Chim. Acta, 61, 53-62 (1975)
- HSU, R.Y., CLELAND, W.W. and ANDERSON, L.
Mechanism of action of the non-specific phosphomonoesterase from potatoes.
Biochemistry, 5, 799-807 (1966)
- HUNTER, R.J.
Serum heat-stable alkaline phosphatase: and index of placental function.
J. Obstet. Gynaec. Brit. Cwlth., 76, 1057 (1969)
- INGLIS, N.R., KIRLEY, S., STOLBACH, L.L. and FISHMAN, W.H.
Phenotypes of the Regan isoenzyme and identity between the placental D-variant and the Nagao isoenzyme.
Cancer Res., 33, 1657-1661 (1973)

- INGLIS, N.R., GHOSH, N.K. and FISHMAN, W.H.
Sephadex G-200 gel electrophoresis of human serum alkaline phosphatase.
Analyt. Chem., 22, 382-386 (1968)
- JENKINS, W.T. and D'ARI, L.
The kinetics of alkaline phosphatase.
J. Biol. Chem., 241, 295-296 (1966)
- KAPLAN, M.M. and ROGERS, L.
Separation of human serum-alkaline-phosphatase isoenzymes by polyacrilamide gel electrophoresis.
Lancet, 1029-1031 (1969)
- KAPLAN, M.D.
Progress in hepatology: alkaline phosphatase.
-Gastroenterology, 62, 452-468 (1972)
- KAY, H.D.
Plasma phosphatase in osteitis deformans and in other diseases of bone.
Br. J. exp. Path., 10, 253-256 (1929)
- KAY, H.D.
Plasma phosphatase. II. The enzyme in disease, particularly in bone disease.
J. Biol. Chem., 89, 249-266 (1930)
- KAZUMASA MIKI, TOSHITSUGU ODA, HIROSHI SUZUKI, SHIRO IINO and MIROHUMI NIWA
Alkaline phosphatase isoenzyme in intestinal metaplasia of the stomach.
Clin. Chim. Acta, 76, 79-88 (1977)
- KEAY, H. and TREW, J.A.
Automated determination of serum alkaline phosphatase using a modified Bodansky Technique.
Clin. Chem., 10, 75-82 (1964)
- KEIDING, N.R.
Differentiation into three Fractions of the Serum Alkaline Phosphatase and the Behavior of the Fractions in Diseases of Bone and Liver.
Scandinav. J. Clin. & Lab. Investigation, 11, 106-112 (1959)

- KEIDING, N.R.
The alkaline phosphatase fractions of human lymph.
Clin. Sci., 26, 291-297 (1964)
- KEIDING, N.R.
Intestinal alkaline phosphatase in human lymph and serum.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 18, 134-140 (1966)
- KEIDING, N.R.
Phosphatases Isoenzymes in Human Serum.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 33, 1-4 (1974)
- KELLEN, J.A. and LUSTIG, V.
Patterns of amino-acid inhibition of alkaline phosphatases
as an aid in cancer diagnosis.
Oncology, 25, 239-248 (1971)
- KIM, J.C., SKASTNY, M. and MANNING, J.P.
Use of a three isoenzyme diagram in assessing activity of
alkaline phosphatase isoenzymes.
Clin. Chem., 20, 816 (1974)
- KIND, P.R.N. and KING, E.J.
Estimation of plasma phosphatase by determination of hydro-
lysed phenol with amino-antipirina.
J. Clin. Pathol., 7, 322, 326 (1954)
- KING, J. and ARMSTRONG, A.R.
A convenient method for determining serum and bilev phos-
phatase activity.
Can. Med. Assoc. J., 31, 376-381 (1934)
- KING, E.J. and DELORY, G.E.
A carbonate veronal buffer solution covering pH 7,5 until
10,7.
Enzymologia, 8, 278-279 (1940)
- KITCHENER, P.N., NEALE, F.C., POSEN, S. and BRUDENELL-WOODS, J.
Alkaline phosphatase in maternal and fetal sera at term
and during the puerperium.
Am. J. Clin. Pathol., 44, 654-661 (1965)
- KIYASU, J. and PENN, O.
A clinically useful differentiation of serum alkaline phos-
phatase isoenzymes in bone and liver disease.
Clin. Chem., 19, 665 (1973)
- KLEIN, B., READ, P.A. and BABSON, A.L.
Rapid method for the quantitative determination of serum
alkaline phosphatase.
Clin. Chem., 6, 269-275 (1960)

- KLEIN, U.E.
Alkaline phosphatase in liver cirrhosis and rectal cancer.
Lancet, 1396 (1968)
- KLOTZ, I.M.
Thermodynamics and molecular properties of some metal protein complexes. In "A Symposium on the mechanism of Enzyme Action" (W.D. McElroy and B. Glass, eds.). p. 257. Johns Hopkins Press. Baltimore, Maryland, 1954
- KORNER, N.H.
Distribution of alkaline phosphatase in serum protein fractions.
J. Clin. Pathol., 15, 195-199 (1962)
- KRESS, L.F., BONO, V.H., Jr., and NODA, L.
The sulphhydryl groups of rabbit muscle adenocine triphosphate-adenosine monophosphate phosphotransferase. Activity of enzyme treated with mercuriels.
J. Biol. Chem., 241, 2293-2300 (1966)
- LABORATORIES HELENA
Alkaline Phosphatase isoenzymes procedure. 1974
- LATNER, A.L.
Phosphatase Isoenzymes. In "Enzymes in Clinical Chemistry" (R. Ruyssen and L. Vandendriessche, pp. 110-119. Elsevier, Amsterdam, 1965)
- LAZDUNSKI, M. and OUELLET, L.
Intestinal alkaline phosphatase: Kinetics of p-nitrophenyl phosphate hydrolysis.
Can. J. Chem., 37, 1298-1309 (1961)
- LAZDUNSKI, M. and OUELLET, L.
Inhibition de la phosphatase alcaline intestinale.
Can. J. Biochem. Physiol., 40, 1619-1639 (1962)
- LAZDUNSKI, M., BROUILLARD, J. and OUELLET, L.
Etude des effets electrostatiques sur le mechanism d'action catalytique de la phosphatase alcaline intestinale de veau.
Can. J. Chem., 43, 2222-2235 (1965)
- LEE, L.M. and KENNY, M.A.
Electrophoretic method for assessing the normal and pathological distribution of alkaline phosphatase isoenzymes in serum.
Clin. Chem., 21/8, 1128-1135 (1975)

- LEVINSON, M., HOLBERT, J., BLACKWELL, C. and WRUBLE, L.D.
GGTP activity in liver disease comparison of its specificity
and clinical value to alkaline phosphatase.
-Gastroenterology, 66, 851 (1974)
- LILIAN, E.M.
Separation of Alkaline Phosphatase Isoenzymes and Evaluation
of the Clinical Usefulness of this Determination.
Am. J. Clin. Pathol., 61, 142-154 (1974)
- LILIAN, M.Y. LEE
Isoenzima no usual de fosfatasa alcalina en un paciente con
marcada elevación de fosfatasa ácida sin evidencia clínica
de carcinoma prostático.
Clin. Chim. Acta, 71, 221-227 (1976)
- LIN, C.W., SIE, H.G. and FISHMAN, W.H.
 α -Tryptophan. A non-allosteric organ specific uncompetitive
inhibitor of human placental alkaline phosphatase.
Biochem. J., 124, 509-516 (1971)
- LOWRY, O.H. and LOPEZ, J.A.
The determination of inorganic phosphate in the presence
of labile phosphate esters.
J. Biol. Chem., 162, 421-428 (1946)
- MALAMY, M.H. and HOVECKER, B.L.
Release of alkaline phosphatase from cells of Escherichia
coli upon lysozyme spheroplast formation.
Biochemistry, 3, 1889-1893 (1964)
- MANABU MASUZAWA, TAKENOBU KAMATA, YASUHIKO SAKAYAMA, YASUTO CHIBA
and ZEN-ICHIOGITA
Studies on alkaline phosphatase isozymes in human serum by
using a simple thin layer polyacrylamide gel electrophoresis.
Seibutsu Butsuri Kagaku, 17, 2, 71-76 (1973)
- MARKERT CLEMENT, L.
The Molecular Basis for Isozymes.
Annals New York Academy of Sciences, 14-39
- MARKERT and MOLLER
Multiple Forms of Enzymes: Tissue, ontogenetic, and Species
Specific Patterns.
Biochemistry, 45, 753-763 (1959)

- MARKET, C.L.
Isoenzymes in Kidney. Development. In: Proceedings of the Thirteenth Annual Conference on Hereditary, Developmental and Immunologic Aspects of Kidney Disease.
(Ed. J. Metcalf) U.P.I., 11, 54 (1961)
- MARKET, C.L. and APPELLA, E.
Physiolchemical nature of isoenzymes.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 94, 678 (1961)
- MARKET, C.L. and URSPRUNG, H.
The ontogeny of isoenzyme patterns of lactate dehydrogenase in the mouse.
Developmental Biol., 5, 363 (1962)
- MARKET, C.L.
Lactate dehydrogenase isoenzyme: Disociation and Recombination of subunits.
Science, 140, 1329 (1963)
- MARKET, C.L.
Biochemical Events during differentiation general Survey.
J. Exp. Zool., 157, 81 (1964)
- MARTLAND, M. and ROBISON, R.
Possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. Part VI. Phosphoric esters in blood plasma.
Biochem. J., 20, 847-855 (1926)
- MASSARRAT, S. and MASSARRAT, S.
Origin of serum alkaline phosphatase in hepatobiliary diseases.
Enzyme, 12, 593 (1971)
- McMASTER, Y., TENNANT, R., CLUBB, J.S., NEALE, F.C. and POSEN, S.
The mechanism of the elevation of serum alkaline phosphatase in pregnancy.
J. Obstet. Gynecol. Brit. Commonwealth, 71, 735-739 (1964)
- MATAMOROS FLORY, N. y. BALCELLS GORINA
Isoenzimas de la fosfatasa alcalina, separación e identificación en extractos de tejidos y suero de individuos normales.
Medicina Clínica, 66, núm. 6, 279-282 (1976)
- MATHIES, J.C.
Preparation and properties of highly purified alkaline phosphatase from swine kidneys.
J. Biol. Chem., 233, 1121-1127 (1958)

- MAURER, H.R.
Disc Electrophoresis and related Technique of Polycrylamide gel Electrophoresis.
Ed. Walter de Gruyter. New York 1971
- MESSER, R.H.
Heat-stable alkaline phosphatase as an index of placental function.
Am. J. Obstet. Gynee., 98, 459-465 (1967)
- MILSTEIN, C.
The amino acid sequence around the reactive serine residue in alkaline phosphatase from *Escherichia coli*.
Biochem. J., 92, 410-421 (1964)
- MITHOEFER, J. and RAPOPORT, S.
Serum alkaline phosphatase in dogs following ligation of the hepatic veins.
J. Lab. Clin. Med., 37, 520-525 (1951)
- MORTON, R.K.
The substrate specificity and inhibition of alkaline phosphatase of cow's milk and calf intestinal mucosa.
Biochem. J., 61, 232-240 (1955)
- MORTON, R.K.
The kinetics of hydrolysis of phenylphosphate by alkaline phosphatases.
Biochem. J., 65, 674-682 (1957)
- MOSS, D.W., CAMPBELL, D.M., ANAGNOSTON-KAKARAS, E. and KING, E.J.
Characterization of tissue alkaline phosphatases and their partial purification by starch - gel electrophoresis
Biochem. J., 81, 441-447 (1961)
- MOSS, D.W.
Iso-enzymes of alkaline phosphatase in autolysed and butanol-extracted liver preparations.
Nature, 193, 891-982 (1962)
- MOSS, D.W.
Heterogeneity of Human Intestinal Alkaline Phosphatase.
Nature, 21, 1206-1207 (1963)
- MOSS, D.W.
Properties of alkaline - Phosphatase Fractions in Extracts of Human Small Intestine.
Biochem. J., 94, 458-462 (1965)

- MOSS, D.W., EATON, R.H., SMITH, J.K. and WHITBY, L.G.
Alteration in the electrophoretic mobility of alkaline phosphatases after with neuraminidase.
Biochem. J., 98, 32c-33c (1966)
- MOSS, D.W., EATON, R.H., SMITH, J.K. and WHITBY, L.G.
Association of inorganic pyrophosphatase activity with human alkaline phosphatase preparation.
Biochem. J., 102, 53-57 (1967)
- MOSS, D.W.
The Heterogeneity of Human Alkaline Phosphatase.
Enzymes and Isoenzymes, 18, 227-239 (1970)
Edited by D. Shugar. Academic Press
- MOSS, D.W.
Alkaline Phosphatase Isoenzymes Studies in Clinical Enzymology.
6° Simposio Internazionale di Enzimologia Clinica celebrado en Venezia en octubre 1974. Publicado por A. Burlina en 1976
- MUNOZ FERNANDEZ, J.R. y ARRAIZA GOICOCHEA, A.
Feto-proteinas del cáncer humano.
Rev. Clin. Esp., 132, 287 (1974)
- NAGANT de DEUXCHAISNES, C. and KRANE, S.M.
Paget's disease of bone: Clinical and metabolic considerations.
Medicine, 43, 233-266 (1964)
- NAGODE, L.A., KOESTNER, A. and STEINMEYER, C.L.
Organ-identifying properties of alkaline phosphatase from canine tissues.
Clin. Chim. Acta, 26, 45-54 (1969)
- NAKAYAMA, T., YOSHIDA, M. and KITAMURA, M.
L-leucine sensitive heat-stable alkaline phosphatase isoenzyme detected in a patient with pleuritis carcinomatosa.
Clin. Chim. Acta, 30, 546-548 (1970)
- NATH, R.L. and RYDON, H.N.
The influence of structure on the hydrolysis of substituted phenyl- β -D-glucosides by emulsin.
Biochem. J., 57, 1-10 (1954)

- NATH, R.L. and GHOSH, N.K.
Studies on serum phosphatases. III. Influence of structure on the hydrolysis of substituted phenyl phosphates by serum alkaline phosphatase.
Enzymologia, 26, 141-154 (1963)
- NATH, R.L. and GHOSH, N.K.
Paper electrophoresis of alkaline phosphatase of rachitic serum.
Bull. Calcutta School Trop. Med., 12, 59-60 (1964)
- NATH, R.L. and GHOSH, I.
Determination of serum alkaline phosphatase with substrates containing branched chain and straight chain alkyl groups.
Enzymologia, 31, 155-162 (1966)
- NATH, R.L. and GHOSH, N.K.
Studies on serum phosphatases. V. Nonspecific human alkaline phosphatase and FDPase in normal and pathological conditions.
Enzymologia, 32, 278-290 (1967)
- NATH, R.L. and SAHA, D.
A thermostable serum alkaline phosphatase.
Clin. Chim. Acta, 55, 5-9 (1974)
- NEALE, F.C., CLUBB, J.S., HOTEHKIS, D. and POSEN, S.
Heat stability of human placental alkaline phosphatase.
J. Clin. Pathol. 18, 359-363 (1965)
- NIKKILA, E.A.
Serum alkaline phosphatase activity in pulmonary infarction.
Scandinav. J. Clin. Lab. Investigation, 11, 405-406 (1959)
- NISSELBAUM, J.S., SCHLAMOWITZ, M. and BODANSKY, O.
Immunochemical studies of functionally similar enzymes.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 94, 970-987 (1961)
- OHLEN, J. y RICHTER, J.
Determinación isoenzimática de las fosfatasas alcalinas para la detección precoz y diagnóstico - diferencial de enfermedades hepatobiliares y óseas.
Dtsch. med. Wschr., 96, 343 (1971)
- ORNSTEIN, L.
Simultaneous preservation of intracellular morphology and enzymatic or antigenic activities in frozen tissues for high resolution histochemistry.
J. Histochem. Cytochem., 7, 291 (1959)

- ORNSTEIN, L.
Disc electrophoresis. I. Background and Theory.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 321-349 (1964)
- OTANI, R., HIGASHINO, K. and AMAMURA, Y.
A novel alkaline phosphatase, a minor component of normal liver phosphatases.
Clin. Chim. Acta, 82, 249-258 (1978)
- PEACOCK, A.C., REED, R.A. and HIGHSMITH, E.M.
Ethanol Fractionation of Human Serum Alkaline Phosphatase.
Clin. Chim. Acta, 8, 914-917 (1963)
- PIGRETTI, M.M. and MILSTEIN, C.
Acid inactivation of and incorporation of phosphate into alkaline phosphatase from *Escherichia coli*.
Biochem. J., 94, 106-113 (1965)
- PLOCKE, D.J., LEVINTHAL, C. and VALLEE, B.L.
Alkaline phosphatase *E. coli*. A zinc metalloenzyme.
Biochem. J., 373-378 (1962)
- PONTREMOLI, S., LUPPIS, B., WOOD, W.A., TRANIELLO, S. and HORECKER, B.L.
Fructose diphosphatase from rabbit liver. II. Changes in catalytic properties induced by dinitrofluorobenzene.
J. Biol. Chem., 240, 3464-3468 (1965)
- POPE, C.E. Jr. and COOPERBAND, S.R.
Protein Characteristics of serum and bile alkaline phosphatase.
Gastroenterology, 50, 631-636 (1966)
- PORTMANN, P.
Zur Kenntnis der alkalischen darmphosphatase.
Z. Physiol. Chem., 309, 87-128 (1957)
- PORTMANN, P., ROSSIER, R. and CHARDENERS, H.
Zur Kenntnis der alkalischen darmphosphatase. II. Untersuchungen über die Homogenität und den chemischen Aufbau der reinen alkalischen Phosphomonoesterase.
Helv. Physiol. Pharmacol. Acta., 18, 414-427 (1960)
- POSEN, S., NEALE, F.C. and CLUBB, J.S.
Heat inactivation in the study of human alkaline phosphatases.
Ann. intern. Med., 62, 1234-1243 (1965)

- POSEN, S., NEALE, F.C., BRUDENELL-WOODS, J. and BIRKETT, D.J.
Continuous determination of enzyme activity during heat
inactivation.
Lancet, 1, 264-265 (1966)
- POSEN, S. NEALE, F.C., BIRKETT, D.J. and BRUDENELL-WOODS, J.
Intestinal alkaline phosphatase in human serum.
Am. J. Clin. Path., 48, 81-86 (1967)
- RAINER MAURER and ROBERT C. ALLEN
Polyacrilamide gel electrophoresis in clinical chemistry:
problems of standardization and performance.
Clin. Chim. Acta, 40, 359-370 (1972)
- RASALKI SIDNEY, B.
Standardization of Isoenzyme Assays with Special Reference
to Lactate Dehydrogenase Isoenzyme Electrophoresis.
Clin. Biochem., 7, 29-40 (1974)
- RAYMOND, S. and WEINTRAUB, L.S.
Acrylamide gel as a supporting medium for zone electropho-
resis.
Science, 130, 711 (1959)
- RIGHETTI, A.B. and KAPLAN, M.M.
Properties of rat liver alkaline phosphatase before and
after bile duct ligation.
Proc. Soc. exp. Biol. Med., 145, 726-728 (1974)
- RHONE, D.P., WHITE, F.M. and GIDASPOW, H.
Isoenzymes of liver phosphatase in serum of patients with
hepatobiliary disorders.
Clin. Chem., 19, 1142 (1973)
- RHONE, D.P., MIZONO, F.M. and -GIDASPOW, H.
Profiles of Alkaline Phosphatase Isoenzymes in Serum Using
Cellulose Acetate Electrophoresis and Organ - specific
Inhibitors.
Am. J. Clin. Pathol., 59, 531-541 (1973)
- ROBERTS, W.M.
Variations in the phosphatase activity in the blood in
disease.
Br. J. exp. Path., 11, 90-95 (1930)
- ROBERTS, W.M.
Blood phosphatase and the van den Bergh reaction in the
differentiation of the several types of the several types
of jaundice.
Brit. Med. J., 1, 734-738 (1933)

- ROBINSON, R.
The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification.
Biochem. J., 17, 286-293 (1923)
- ROBINSON, R. and SOAMES, K.M.
The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. The phosphoric esterase os ossifying cartilage.
Biochem. J., 18, 740-754 (1924)
- ROBINSON, J.C. and PIERCE, J.E.
Differential Action of Neuaminidasa in Human Serum Alkaline Phosphatase.
Nature, 204, 472-473 (1964)
- ROBINSON, J.C. and PIERRE, J.E.
Leukocyte alkaline phosphatase: electrophoretic variants associates with Chronic myelogenous leukemia.
Science, 150, 58 (1965)
- ROBINSON, J.C. and GOLDSMITH, L.A.
Genetically determined variants of serum alkaline phosphatase: a review.
Vox Sang, 13, 289-307 (1967)
- ROBSON, E.B. and HARRIS, H.
Genetics of the alkaline phosphatase polymorphism of the human placenta.
Nature, 207, 1257 (1965)
- ROBSON, E.B. and HARRIS, M.
Further studies on the genetics of placental alkaline phosphatase.
Ann. Hum. Genet., 30, 219-232 (1967)
- ROCHE, J. and SARLES, H.
Organ specificity of alkaline phosphatases and (the phosphatase of) hyperphosphatasemia.
Bull. Soc. Chim. Biol., 33, 667-672 (1951)
- ROSENBERG, I.N.
Zone electrophoretic studies of serum alkaline phosphatase.
J. Clin. Invest., 38, 630-644 (1959)
- ROSS, M.H., ELY, J.O. and ARCHER, J.G.
Alkaline phosphatase activity and pH optima.
J. Biol. Chem., 192, 561-568 (1951)

- ROUND, J.M.
Plasma calcium, magnesium phosphorus and alkaline phosphatase levels in normal British Schoolchildren.
Brit. Med. J., 3, 137 (1973)
- SADOVSKY, E. and ZUCKERMAN, H.
An alkaline phosphatase specific to normal pregnancy.
Obstet. Gynecol., 26, 211-214 (1965)
- SARASWATHI, S. and BACHAWAT, B.K.
Phosphatases from human brain. I. Purification and properties of pyridoxal phosphate phosphatase.
J. Neurochem., 10, 127-133 (1963)
- SARASWATHI, S. and BACHAWAT, B.K.
Heterogeneity of alkaline phosphatase in sheep brain.
J. Neurochem., 13, 237-246 (1966)
- SARLES, H.
Role of the liver in the regulation of the alkaline phosphatase activity of the blood.
Compt. Rend. Soc. Biol., 147, 1747-1750 (1953)
- SATALINE, L.R. and MATRE, W.J.
Significance of hyperphosphatasemia in alcoholics with liver disease.
Am. J. Med., 35, 323 (1963)
- SCHLAMOWITZ, M.
Production of antibodies against dog intestinal phosphatase.
J. Biol. Chem., 206, 361-367 (1954)
- SCHLAMOWITZ, M. and BODANSKY, O.
Tissue sources of human serum alkaline phosphatase as determined by immunochemical procedures.
J. Biol. Chem., 234, 1433-1437 (1959)
- SCHLANG, H.A. and MCHENRY, L.E., Jr.
High serum alkaline phosphatase.
N.Y. State J. Med., 62, 3811-3813 (1962)
- SCHLERINGER, M.J. and BARRETT, K.
The reversible dissociation of the alkaline phosphatase of *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem., 240, 4284-4292 (1965)
- SCHMIDT, G. and THANHAUSER, S.J.
Intestinal phosphatase.
J. Biol. Chem., 149, 369-385 (1943)

- SCHWARTZ, J.H.
The phosphorylation of alkaline phosphatase.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 49, 871-878 (1963)
- SEBESTA, D.G., BRADSHAW, F.J. and PROCKOP, D.J.
Source of the elevated Serum Alkaline Phosphatase Activity
in Biliary Obstruction: Studies Utilizing Isolated Liver
Perfusion.
Clin. Res., 47, 166-170, n° 2 (1964)
- SERENY, G. and McLAUGHLIN, L.
Serum alkaline phosphatase values in normal adolescents.
J. Canad. Med. Ass., 102, 1400 (1970)
- SHERLOCK, S. and WALSHE, V.
Hepatic alkaline phosphatases: Histological and microchem-
ical studies on liver tissue in normal subjects and in
liver and bone disease.
J. Pathol. Bacteriol., 59, 615-630 (1947)
- SHERLOCK, S.
Diseases of the liver and biliary system.
3rd ed., p. 43. Blackwell, Oxford, 1963
- SHINOWARA, G.Y., JONES, L.M. and REINHART, H.L.
The estimation of serum inorganic phosphatase and acid and
alkaline phosphatase activity.
J. Biol. Chem., 142, 921-933 (1942)
- SHREFFER, D.C.
Relationship of alkaline phosphatase level in intestinal
mucosa to ABO and secretor blood groups.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 123, 423-427 (1966)
- SIMS, M.
Methods for detection of enzymatic activity after electro-
phoresis on polyacrylamide gel in *Drosophila* species.
Nature, 207, 757-758 (1965)
- SIZER, I.W.
The action of certain oxidants and reductants upon the
activity of bovine phosphatase.
J. Biol. Chem., 145, 405-414 (1942)
- SKILLEN, A.W., FIFIELD, R.D. and SHERAIDAH, G.S.
Serum Alkaline Phosphatase Isoenzyme Patterns in Disease.
Clin. Chim. Acta, 40, 21-25 (1972)

- SKILLEN, A.W. and HARRISON, J.
Serum Alkaline Phosphatases - Effect of pH and Buffer on
Optimum Substrate Concentration
Clin. Chim. Acta, 45, 287-291 (1973)
- SKILLEN, A.W. y PIERIDES, A.M.
Actividad de la g-glutamyl-transpeptidasa y fosfatasa al-
calina en epileptico con terapia anticonvulsivante.
Clin. Chim. Acta, 72, 245-251 (1976)
- SMITH EDGAR E. and RUTENBURG ALEXANDER M.
The heterogeneity of serum amino acid naphthylamidase in
Liver Metastases.
Biochemical Medicine, 4, 418-424 (1970)
- SCHMIDT, G. and THAUHAUSER, S.J.
Intestinal phosphatase.
J. Biol. Chem., 149, 369-385 (1943)
- SMITH, I., LIGHTSTONE, P.J. and PERRY, J.D.
Separation of human tissue alkaline phosphatase electro-
phoresis on acrylamide disc gels.
Clin. Chim. Acta, 19, 499-505 (1968)
- SCHWARTZ, J.H., CRESTFIELD, A. and LIPMANN, F.
The amino acid sequence of a tetradecopeptide containing
the reactive serine in E. coli alkaline phosphatase.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 49, 722-729 (1963)
- SMITHIES, O.
Zone electrophoresis in starch-gels: Group variation in
the serum proteins of normal human adults.
Biochem. J., 61, 629-641 (1955)
- STANLEY, E., VERMILLJOU, M.D., CABE, G., MORLOCK, M.D., LLOY, D.G.,
BARTHOLOME, W.M., PANAYOTIS, P. and KELALIS, M.D.
Nephrogenic hepatic Dysfunction secondary to tumefactive
xanthogranulomatous pyelonephritis.
Annals of Surgery, Vol. 171, p. 130-136, number 1, 1970
- STEIN, S.S. and KOSHLAND, D.E., Jr.
Mechanism of Action of Alkaline Phosphatase.
Biochem. J., 229-230 (1959)
- STEPAN, J., VOLEKAND, V. and KOLAR, J.
A modified inactivation inhibition method for determining
the serum activity of alkaline phosphatase isoenzymes.
Clin. Chim. Acta, 69, 1-9 (1976)

- STRITTMATTER, C.F.
Development of Disaccharidase and Phosphatase Activities
in the Intestine and Liver.
Enzyme, 15, 24-39 (1973)
- STERMMERMANN, G.N.
An histological and histochemical study of familial
osteoectasia.
Am. J. Path., 48, 641-651 (1966)
- SUBRAMONIA, M.A.
Effect of Maternal protein deficiency on intrauterine.
Development of small intestine with special reference to
alkaline phosphatase.
Enzyme, 23, 194-200 (1978)
- SUNDBLAD, L., MARTA WALLIN-NILSSON and JOHAN BROHULT
Characterization of alkaline phosphatase isoenzymes in se-
rum by agar gel electrophoresis.
Clin. Chim. Acta, 45, 219-223 (1973)
- SUSSMAN, H.H., SMALL, P.A. and COTLOVE, E.
Human alkaline phosphatase. Immunochemical identification
of organ-specific isoenzymes.
J. Biol. Chem., 243, 160-166 (1968)
- SUSSMAN, H.H. and GOTTLIEB, A.J.
Human placental alkaline phosphatase. II. Molecular and
subunit properties of the enzyme.
Biochim. Biophys. Acta, 194, 170-179 (1969)
- SUSSMAN H.H.
Source of the Increased Serum Alkaline Phosphatase Activi-
ty in Paget's Disease.
Clin. Chim. Acta, 27, 121-124 (1970)
- TANAKA, F., NOBUYUKI AMINO, CHOZO HAYASHI, KIYOSHI MIYAI and
YUICHI KUMAHARA
Abnormal serum lactate dehydrogenase isoenzyme in a case
of laryngeal carcinoma and thyrotoxicosis.
Clin. Chim. Acta, 68, 235-240 (1976)
- THOMPSON, R.C., GAULL, G.E., HORWITZ, S.J. and SCHEULE, R.K.
Hereditary hyperphosphatasia. Study of three siblings.
Am. J. Med., 47, 209-219 (1969)

- TSUNG, S.H. and REPKE, D.W.
Heat Inactivation and Determination of Serum Gamma
-Glutamyltranspeptidase as a Profile in Identification
of Human Alkaline Phosphatase.
Am. J. Clin. Pathol., 61, 606-611 (1974)
- USATEGUI, G.M., YEAGER, F.M. and TARBUTTON, P.
Purification of Human Placental Alkaline Phosphatase by
Isoelectric Focusing.
Clin. Chim. Acta, 50, 405-412 (1974)
- VALLEE, B.L.
Metal and enzyme interactions: Correlation of composition,
function, and structure.
In: "The Enzymes" (P.D. Boyer, H. Lardy and K. Myrback,
eds.), 2nd ed., vol. 3, part B, pp. 225-276. Academic Press,
New York, 1960
- VIEDMA, J.A.
Bioestadística (Métodos estadísticos en medicina y biolo-
gía).
-Gráfica Internacional (España). 1976
- WALKER, B.A., EZE, L.C., TWEEDIE, M.C.K. and EVANS, D.A.F.
The influence of ABO bloodgroups, secretor status and fat
ingestion on serum alkaline phosphatase.
Clin. Chim. Acta, 35, 433-444 (1971)
- WALKER, A.W.
Intestinal Alkaline Phosphatase in Serum of Patients on
Maintenance Haemodialysis.
Clin. Chim. Acta, 55, 399-405 (1974)
- WARNES, T.W.
Pancreatic alkaline phosphatase and a tumor variant.
Gut, 13, 513 (1972)
- WARNES, T.W.
Serum alkaline phosphatase isoenzymes in liver disease.
Gut, 13, 853 (1972)
- WARNOCK, M.L.
Characterization of tissue and serum alkaline phosphatases.
Clin. Chim. Acta, 14, 156-165 (1966)
- WARNOCK, M.L.
Intestinal phosphatase and fat absorption.
Proc. Soc. exp. Biol. Med., 129, 768-771 (1968)

- WARREN, M.M., KELALIS, P.P. and UTZ, D.C.
The changing concept hypernephroma.
J. Urol., 104, 376 (1970)
- WIELAND, T.H. and PFLEIDERER, G.
Chemical differences between multiple forms of lactic acid dehydrogenases.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 94, 691-700 (1961)
- WIELAND, T. and PFLEIDERER, G.
Angew. Chem. Internat. Ed. 1169 (1962)
cita tomada de Wilkinson. Isoenzymes, 2nd edition
(Chapman Hall, London 1970)
- WILKINSON, J.H.
Isoenzymes.
2nd edition (Chapman Hall, London 1970)
- WILSON, I.B., DAYAN, J. and CYR, K.
Some properties of alkaline phosphatase from *Escherichia coli*. Transphosphorylation.
J. Biol. Chem., 239, 4182-4185 (1964)
- WILSON, I.B. and DAYAN, J.
The free energy of hydrolysis of phosphoryl phosphatase.
Biochemistry, 4, 645-649 (1965)
- WOLFSON, W.Q.
Localization of alpha-2-globulin by demonstration of alkaline phosphatase during paper electrophoresis.
Nature, 180, 550-551 (1957)
- WOLF, M., DINWOODIE, A. and MORGANK, H.G.
Comparison of alkaline phosphatase isoenzymes activity using five standard methods.
Clin. Chim. Acta, 24, 131-134 (1969)
- ZUCKERMAN, H. and SADOVSKY, E.
Thermostable alkaline phosphatase in pregnancy.
Israel J. Med. Sci., 1, 230-234 (1965)

IX. Anexos

ANEXO n° 1

SUEROS NORMALES

A.F. : Actividad Fosfatásica en U.I.

Dist.: Distancia recorrido por la banda anódica en cm.

N°	Identf.	Sexo	Grupo	A.F.	Dist	% activ. fosf. y posición banda en el gel													
						Edad	Sang.	U.I.	cm.	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
1	20/257	H	23	20	6,3	9												91	
2	18/266	V	28	45	5,7	11									7			82	
3	20/258	H	22	21	6,5	6							2	32	15			45	
4	23/253	H	26	24	7,0	6										47		47	
5	23/255	H	48	29	6,4	6							12			29		53	
6	17/302	H	36	13	5,9	9												91	
7	17/303	V	19	25	6,0	7												93	
8	18/259	H	50	28	5,4	9												91	
9	18/260	V	60	29	5,4	8												92	
10	17/298	H	22	17	5,5	8												92	
11	17/299	H	22	19	5,5	6			4				10					69	
12	17/300	H	28	18	5,2	6		8					18					69	
13	17/301	V	24	17	4,8	8			4				15					74	
14	18/256	H	28	17	8,4	8												92	
15	18/255	H	40	45	8,1	5			1			8	7		28			41	
16	18/254	H	22	20	7,4	7			2									91	
17	18/257	V	40	25	6,7	5												95	
18	17/280	H	26	13	6,7	5												95	
19	17/279	V	56	32	7,2	8												92	
20	17/277	V	31	20	8,0	6												94	
21	1/17	V	58	54	7,2	8												92	
22	23/258	H	37	16	5,8	6							7					87	
23	16/274	H	37	21	5,7	5												95	
24	17/273	H	34	16	5,9	5									13			82	
25	16/275	H	22	17	6,9	7												93	

SUEROS NORMALES

N°	Identf.	Sexo Edad	Grupo Sang.	A.F. Dist U.I. cm.	% activ. fosf. y posición banda en el gel											
					0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
26	17/274	H 25		19	6,0	9										91
27	17/275	H 25		11	6,7	11										89
28	26/305	V 26		61	6,2	5						3				92
29	26/306	V 43		27	5,1	10							5			85
30	17/277	H 26		12	7,0	7										93
31	17/276	H 43		26	8,3	6									33	61
32	17/294	H 49		31	5,3	10								13		77
33	11/362	H 40		21	6,1	12			1							87
34	17/295	H 23		16	5,4	8										92
35	17/296	H 20		16	6,9	7		8					15			70
36	17/297	H 42		15	5,4	19										81
37	19/242	H 28		14	6,2	6										94
38	19/243	V 35		19	6,8	10										90
39	19/244	H 25		30	6,3	12										64
40	19/245	H 44		19	6,4	10										90
41	18/261	H 30		14	6,2	12										88
42	18/263	V 23		22	5,4	14										86
43	18/264	V 25		25	5,7	10										90
44	18/265	H 22		27	5,3	9										91
45	25/279	H 20		14	7,1	4									46	50
46	24/250	H 28		18	7,1	5					5		5	41		44
47	25/281	H 18		38	7,9	3								10	51	36
48	24/251	H 25		19	6,6	5									42	53
49	25/283	H 22		19	7,4	11										89
50	3/235	V 31		20	6,7	3										97
51	3/236	H 22		16	6,4	5										95
52	3/237	H 27		21	7,5	5										95
53	3/238	H 23		19	6,6	5										95
54	3/240	H 37		25	6,7	5										95
55	3/239	H 24		21	7,8	10										90
56	4/284	V 35		25	7,0	4										96
57	4/285	H 19		25	7,3	4										96

SUEROS NORMALES

=====

N°	Identf.	Sexo	Grupo	A.F. Dist	U.I. cm.	% activ. fosf. y posición banda en el gel														
						0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100				
58	4/284	H	25		21	6,6	10				5			15		70				
59	11/267	H	39		10	5,5	7									93				
60	9/266	H	27		19	6,6	9								42	49				
61	9/265	H	42		16	6,4	7	1								92				
62	15/288	H	40		21	7,3	5									95				
63	16/273	H	32		14	7,1	6									94				
64	16/276	V	25		34	6,2	7									93				
65	15/289	H	40		26	6,5	4					15			34	47				
66	16/277	H	24	A ₁ +	13	6,1	6									94				
67	15/287	H	40		26	6,5	7					1	1			91				
68	11/269	H	30		25	7,4	11									89				
69	24/252	V	25		22	7,5	5								42	53				
70	25/280	V	59		24	7,8	2					10			28	60				
71	25/284	H	26		12	7,5	6								51	43				
72	25/285	H	24	B-	19	7,5	9					8	12		28	43				
73	25/286	H	35		23	7,8	8									92				
74	26/262	V	43		23	8,5	16					2	24		16	42				
75	23/256	H	21		21	7,5	7								47	45				
76	23/257	H	24		18	6,3	2					11	27		10	50				
77	24/248	V	24		24	6,6	7								57	36				
78	24/249	H	20	0+	21	7,1	5					11			52	32				
79	24/247	H	52		16	7,6	9	1							48	42				
80	26/263	H	27		16	6,2	6									94				
81	26/265	V	29		42	7,6	14							8	40	38				
82	26/266	H	38		23	7,9	5					12			42	41				
83	26/267	H	27		22	6,3	13									87				
84	1/272	H	27		22	5,9	8							16		76				
85	1/273	H	27	0+	29	5,1	8							19		73				
86	1/274	H	30	0+	15	5,1	10									90				
87	2/277	H	22		17	6,0	19							8		73				
88	2/278	H	20		29	5,6	4		1				8			87				

SUEROS NORMALES

N°	Identf.	Sexo	Grupo	A.F.Dist	% activ. fosf. y posición banda en el gel										
					0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
89	2/279	H	30	15	5,2	7							5		88
90	2/280	H	40	19	6,1	6									94
91	2/281	H	35	30	5,8	10							5		85
92	2/282	H	42	19	6,2	6								50	44
93	2/283	V	34	38	6,1	14	3				20		28		35
94	3/233	H	18	31	5,9	8						3			89
95	3/234	H	20	23	6,1	8									92
96	4/287	H	45	35	7,2	10									90
97	4/288	V	32	18	7,2	4									96
98	10/295	H	22	21	6,9	5							11		84
99	10/297	H	24	10	6,8	11									89
100	9/269	H	42	16	7,7	11									89
101	9/268	H	25	19	7,0	6								50	44
102	10/296	H	52	12	7,4	11									89
103	9/264	H	27	14	5,5	5							25		70
104	10/298	H	51	16	6,7	10									90
105	11/266	H	57	26	5,5	10	1					1			88
106	11/268	H	22	18	5,7	12									88
107	11/264	H	43	16	4,0	16	1					1			83
108	11/265	H	62	26	5,0	3									97
109	12/285	H	28	23	5,8	3									97
110	11/270	H	48	17	5,2	14	1					15			71
111	12/284	H	58	38	4,8	8									92
112	10/300	H	49	23	8,0	10	1							55	35
113	9/267	H	30	21	7,3	10									90
114	10/301	H	30	15	6,6	10								39	51
115	28/27	H	A ₁ +	25	6,5	8	5								87
116	28/22	V	A ₁ +	34	6,9	12		4				1			83
117	28/28	V	A ₁ +	43	6,5	7	1	3							89
118	28/10	V	A ₁ +	20	6,1	8		3	4						84
119	12/ 3	H	46	22	5,8	7									93

SUEROS NORMALES

N°	Identf.	Sexo	Grupo	A.F. Dist	U.I. cm.	% activ. fosf. y posición banda en el gel										gel
						0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
120	12/ 4	V 42	A ₁ +	22	5,9	8				1						91
121	12/ 7	V	A ₁ +	30	5,8	8										92
122	12/ 8	V 36	A ₁ +	25	5,1	8										92
123	12/ 9	V 39	A ₁ +	24	5,4	9										91
124	12/11	H	A ₁ +	23	5,8	3										97
125	12/15	V 35	A ₁ +	38	5,9	4			1							95
126	12/17	V	A ₁ +	30	6,2	8										92
127	12/13	H 38	A ₁ +	20	6,0	8										92
128	12/21	V	A ₁ +	29	5,9	5										95
129	12/22	V	A ₁ +	27	6,2	5										95
130	21/15	H	A ₁ +	20	7,9	9				4			6	30	20	31
131	28/13	V	A ₁ +	34	6,9	4		2	3							91
132	21/14	V	A ₁ +	45	7,7	4		3		2		8	23			60
133	21/13	H	A ₁ +	21	6,8	6				2			6		36	50
134	12/13	H 38	A ₁ +	20	7,1	6										94
135	14/20	H	A ₁ +	24	7,7	15		1					10			74
136	14/15	V	A ₁ +	23	6,6	2		1								97
137	14/ 8	V	A ₁ +	32	6,5	8		1								91
138	14/14	V	A ₁ +	24	6,4	8	1	1								90
139	14/20	H	A ₁ +	24	6,3	5			2							93
140	28/ 3	H	A ₁ +	31	6,8	20										80
141	12/ 1	V 38	A ₁ +	33	5,4	14										86
142	9/ 6	H 32	A ₁ +	36	5,0	12			6				4		40	38
143	9/ 3	V 56	A ₁ +	43	5,8	12									48	40
144	14/22	V	A ₁ +	27	6,6	4		1						5		90
145	9/12	V 23	A ₁ +	38	5,5	9									51	40
146	9/ 1	V 52	A ₂ +	18	5,2	13			7							80
147	14/10	V	A ₂ +	29	7,4	5		1					1			93
148	12/ 6	V 40	A ₂ +	20	4,9	15										85
149	28/24	H	A ₂ +	20	7,8	7								8	8	75
150	14/24	V	A ₂ +	29	6,4	5			7							88

SUEROS NORMALES

N°	Identf.	Sexo	Grupo	A.F. Dist	U.I. cm.	% activ. fosf. y posición banda en el gel											
						0	10	20	30	40	50	60	70	80	90		100
151	28/14	V	A ₁ -	20	7,0	6	1	2	2								89
152	28/23	V	A ₁ -	40	6,4	10		2	2								86
153	28/ 1	H	A ₁ -	19	6,5	20				6							74
154	14/ 1	V	A ₁ -	27	7,7	4		1									96
155	14/ 7	V	A ₁ -	29	6,8	9			4								87
156	28/12	V	A ₁ -	30	7,4	14			5	7							74
157	21/ 9	H	A ₁ -	28	6,6	9		1	1	1							88
158	21/10	V	A ₁ -	24	6,2	9					5			36			50
159	28/16	V	A ₁ -	19	7,3	7			2	5							86
160	28/ 6	H	A ₁ -	35	8,2	7		1	7								86
161	21/ 7	V	A ₁ -	38	7,9	9			3						8		80
162	28/20	H	A ₁ -	13	7,0	10				4							86
163	21/11	V	A ₁ -	16	6,4	13		7									80
164	21/ 3	V	B ⁺	37	6,0	10		4									86
165	14/17	V	B +	29	5,9	1			1	1							98
166	14/16	V	B +	47	7,8	7									3		90
167	12/10	V	B +	28	6,2	7		1					6				86
168	28/ 2	V	B +	26	6,5	9				4	3		5				78
169	14/21	V	B +	35	7,1	5		3					20	19			53
170	28/25	V	B +	32	7,4	14			1	1				6			78
171	28/30	V	B +	27	6,8	10			1	2							87
172	14/16	V	B +	47	7,7	3			2	2					40		52
173	28/ 9	H	A ₂ B ⁺	28	6,7	10			1		1			3			85
174	28/ 8	V	A ₂ B ⁺	29	7,0	7				8							85
175	21/ 5	H	A ₂ B ⁺	21	6,2	6			5					4			85
176	21/ 1	V	O ⁻	31	6,0	13			4	5					18		60
177	21/12	V	O -	23	6,1	7			4				11				78
178	21/ 4	H	O -	38	6,3	2		4							34		60
179	28/19	V	O -	39	6,2	5	1		1	2			17				74
180	9/ 9	H	O -	25	6,0	5							26		42		27
181	28/26	H	O -	19	7,0	8	1	1	2				3		34		50

SUEROS NORMALES

N°	Identf.	Sexo	Edad	Grupo Sang.	A.F. Dist U.I. cm.	% activ. fosf. y posición banda en el gel														
						0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100				
182	21/ 1	V	0 -	31	6,1	10	1	1	2										86	
183	28/ 4	H	0 -	35	5,5	8		2	2			3					35		50	
184	14/13	V	0 -	32	7,3	3		2	1				1						93	
185	28/ 7	V	0 -	31	8,1	12			5										84	
186	21/ 6	H	0 -	25	6,8	7	4	1											88	
187	28/29	H	0 -	21	7,1	8	1	3	2			1							85	
188	28/ 5	V	0 -	52	7,7	12	2												86	
189	14/18	V	0 -	26	7,0	2		1	1								7		90	
190	14/19	V	0 +	50	7,2	10	6	2				4	2				38		38	
191	12/ 2	V 25	0 +	35	4,9	4			1			17					39		39	
192	9/11	V 31	0 +	50	5,1	10			3		7	11							69	
193	9/10	V 38	0 +	27	5,9	9			2			16					43		30	
194	9/ 8	V 39	0 +	34	6,1	6		3	3										88	
195	9/ 7	H 23	0 +	34	6,6	5						22					13		60	
196	9/ 5	V 48	0 +	41	6,7	6						21				15			57	
197	9/ 4	V 40	0 +	32	4,4	6													94	
198	9/ 2	V 38	0 +	63	5,1	14		4				11							71	
199	12/16	V 32	0 +	32	5,1	9		1											90	
200	12/285	H 28		23	5,8	3													97	
201	14/ 9	V	0 +	20	7,5	3			1										96	
202	14/ 6	V	0 +	32	7,2	5				1						10			84	
203	14/ 3	V	0 +	34	7,3	1	1	1						16			45		37	
204	14/ 2	V	0 +	25	7,8	8		3	1					14					74	
205	14/ 1	V	0 +	26	8,4	6		1	2					10		8			63	
206	14/23	V	0 +	27	7,5	8	2	1						2	2	4			82	
207	12/14	H	0 +	18	5,0	9													91	
208	14/15	V	0 +	36	8,1	14													86	
209	14/19	V	0 +	50	8,0	3		1				5				3			88	
210	14/11	V	0 +	22	6,6	4			1	1				4					91	
211	12/14	V 41	0 +	25	6,7	8				2									90	
212	21/16	H	0 +	25	8,3	8				6						19	21		44	

SUEROS NORMALES

=====

N°	Identf.	Sexo	Grupo	A.F.Dist	U.I. cm.	% activ. fosf. y posición banda en el gel										gel
						0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
213	28/15	H	0 +	31	7,3	7		6						44		45
214	28/21	H	0 +	20	7,7	7	1	1	2							89
215	14/15	V	0 +	36	7,7	10	7						19	24	20	20
216	28/17	V	0 +	42	7,0	9		3	7							81
217	28/18	H	0 +	28	6,6	9	2	3					4			82
218	12/ 5	H 32	0 +	28	5,8	6										94
219	14/23	V	0 +	27	6,7	6										94
220	28/11	V	0 +	33	7,3	7	1	3	2		7	7	2			71
221	9/ 1	V 48		28	5,5	4										96
222	10/ 1	V	0 +	32	5,2	11		5					15			69
223	11/ 1	V	A ₂ -	31	8,8	9										91
224	12/ 1	V	0 ² +	25	7,2	11			1				8			80
225	13/ 1	H	A ₁ +	18	4,5	6				1						94
226	1/68	V	0 ¹ +	29	4,0	8										92
227	1/72	H	A ₁ +	19	5,0	5										95
228	1/84	H	A ₂ +	20	5,0	5							1			94
229	1/85	H	0 ² +	28	4,7	10		1					12			77
230	4/12	V	0 +	32	4,4	15										85
231	4/13	V	A ₁ -	18	4,2	18										82
232	4/278	H	0 ¹ +	31	4,9	5							10			85
233	4/279	H	A ₁ +	11	4,7	3										97
234	4/268	H	0 ¹ -	36	4,1	9										91
235	5/24	H	0 +	33	4,5	10			2				28			60
236	5/25	H	0 +	24	4,6	10							13		17	60
237	5/26	H 53		25	4,8	8										92
238	5/27	V	0 +	40	4,6	15									17	68
239	5/90	H	0 +	31	4,2	7							8			85
240	5/92	H	0 -	11	4,9	3									32	65
241	5/93	H	A ₂ -	32	6,4	6									62	32
242	5/94	H	0 ² +	26	4,2	13										87
243	5/95	V	A ₁ +	34	5,4	2										98

SUEROS NORMALES

N°	Identf.	Sexo Edad	Grupo Sang.	A.F. Dist U.I. cm.	%activ. fosf. y posición banda en el gel										
					0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
244	6/100	H 22		30	5,0	8	2								90
245	6/102	H		29	5,0	2		1			32		36		14
246	6/104	H	B -	39	6,0	5	9								86
247	6/105	V	O -	26	8,2	1							14	42	43
248	14/12	V	A ₂ -	29	8,3	6			3						91
249	14/21	V	B ₂ +	35	7,2	4									96
250	7/150	V	A ₂ +	29	7,7	9		1				5			85
251	21/ 8	H	A ₂ -	56	6,7	15							5	40	40
252	14/17	V	B ₂ +	29	7,1	8									92
253	9/250	H 30	B +	27	8,3	14								39	47
254	9/251	V	O +	30	5,5	7		2				10		37	44
255	9/252	V	A ₁ +	26	5,9	13		2						37	48
256	9/253	V	A ₁ +	35	5,2	7									93
257	9/254	V	O ₁ +	33	5,3	1		3			9	9	9	36	33
258	9/255	V	O +	30	5,9	2								67	31
259	9/256	V	A ₁ +	39	5,4	4									96
260	10/170	V	A ₁ +	33	6,2	4								39	57
261	10/17	V	O ₁ +	46	5,4	10		2				21		36	31
262	10/172	V	A ₂ -	42	6,0	10								34	56
263	10/173	V	O ₂ +	42	5,6	17		2				8	20	33	20
264	10/174	V	O -	42	5,5	12		4			3	10	10	27	34
265	10/175	V	A ₁ +	28	6,5	18						2		30	50
266	10/176	V	O ₁ -	30	5,6	14		1					13	29	43
267	5/108	V	A ₁ -	28	5,3	13									87
268	5/109	V	A ₁ -	59	6,3	11								45	44
269	5/110	V	B ₁ +	55	6,9	7		1					13	48	48
270	5/111	V	A ₁ +	50	6,1	12								48	48
271	7/200	H	A ₁ B+	35	6,5	10								52	38
272	7/201	V	A ₁ +	31	5,4	3									97
273	7/202	V	A ₁ +	29	5,7	8									92

SUEROS NORMALES

N°	Identf.	Sexo	Edad	Grupo Sang.	A.F. Dist		%activ. fosf. y posición banda en el gel													
					U.I.	cm.	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100			
274	7/203	H	25		28	6,6	3										60	37		
275	7/204	V		A ₁ +	55	6,2	13											87		
276	7/205	H		O ₁ +	31	6,7	6										50	44		
277	7/206	H		A ₁ +	46	6,7	7											93		
278	7/207	V		A ₁ +	36	6,6	6											94		
279	7/208	V		A ₁ +	46	5,4	6											94		
280	7/209	V		O ₁ +	62	6,7	9	3						21			26	41		
281	7/209	H		O +	39	6,8	4							8			29	59		
282	17/70	H		O +	33	5,6	4	13										83		
283	17/71	V		B +	40	7,3	5							2	36			57		
284	17/72	H		A ₁ +	35	7,0	10											90		
285	17/73	H		A ₁ +	31	5,9	5											95		
286	17/74	V		A ₁ +	38	6,9	5											95		
287	17/75	V		A ₁ +	29	6,5	5											95		
288	17/76	V		A ₁ +	31	5,3	5											95		
289	17/77	V		O ₁ +	68	6,6	5					8				22		65		
290	17/78	V		A ₁ +	43	5,8	7											93		
291	17/79	V		O ₁ +	41	6,6	4										13	83		
292	25/ 5	V		A ₁ +	50	7,3	1									13	30	56		
293	25/ 6	V		O ₁ +	43	6,2	7											93		
294	25/ 7	V		A ₁ B+	27	6,8	1	1								18	27	53		
295	25/ 8	V		O ₁ +	43	8,4	8									14	25	53		
296	25/ 9	V		B +	62	7,3	8										38	54		
297	25/10	V		A ₁ +	50	7,1	20							2			38	40		
298	25/11	V		O ₁ -	47	7,9	5											95		
299	25/12	V		A ₂ +	35	7,7	9										47	44		
300	25/13	V		O ₂ +	64	8,3	2		1						4	20	26	49		
301	25/14	V		O +	51	5,9	3				4				28		20	45		
302	25/15	H		A ₁ B+	52	6,8	3									16	34	46		
303	25/16	V		O ₁ +	23	6,2	2					5				13		80		

SUEROS NORMALES

=====

N°	Identf.	Sexo	Grupo	A.F.Dist		% activ. fosf. y posición banda en el gel													
				U.I.	cm.	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100			
304	25/17	V	B +	34	7,7	14								13	20	20	33		
305	31/270	V	B -	47	8,3	6								9	25	26	34		
306	31/271	V	A ₁ B+	29	3,4	10											90		
307	31/272	V	O ₁ +	26	7,0	4				3				4		40	49		
308	31/273	V	O +	21	4,6	2										33	65		
309	31/274	V	B +	24	4,2	3											97		
310	31/275	V	O +	33	4,3	10							1			44	45		
311	3/300	V	A ₁ +	42	6,5	11									31	29	29		
312	3/301	V	A ₁ +	42	6,6	5										37	58		
313	3/302	V	A ₁ +	31	7,0	7										37	56		
314	3/303	V	A ₁ +	34	8,9	7										53	40		
315	3/304	V	A ₁ +	28	7,5	10									5	36	49		
316	3/305	V	A ₂ +	25	7,0	6											94		
317	3/306	V	A ₂ +	21	6,7	6										37	57		
318	3/307	V	A ₂ +	29	7,6	9										45	46		
319	3/308	V	A ₁ -	26	6,3	6											94		
320	7/50	V	A ₁ -	30	7,2	12										42	56		
321	7/51	V	O ₁ +	27	7,1	4									4	35	57		
322	7/52	V	O +	27	6,9	6	3			15		10			28	19	19		
323	7/53	V	O +	27	7,7	-										23	70		
324	7/54	V	O +	25	4,0												94		
325	7/55	V	O +	39	7,7	5										34	61		
326	7/56	V	B -	37	7,2	4					8				30	24	24		
327	7/57	V	B -	34	7,3	17										49	34		
328	7/58	V	B +	43	6,3	14					3	4			16	16	47		
329	7/59	V	B +	37	5,8	15									10	41	34		
330	7/60	H	A ₁ B-	34	6,4	17										40	43		
331	11/150	V	A ₁ +	41	7,2	5											95		
332	11/151	V	A ₁ +	33	7,3	10										47	43		
333	11/152	V	O ₁ +	42	8,8	12						10	11	27	20	20			

SUEROS NORMALES

=====

N°	Identf.	Sexo Edad	Grupo Sang.	A.F.Dist U.I. cm.	% activ. fosf. y posición banda en el gel												
					0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100		
334	11/153	V	O +	33	8,0	3						1		22	23	51	
335	11/154	V	O +	19	7,9	2					1			14	15	68	
336	11/155	V	O +	21	5,3	3						8	8		28	53	
337	11/156	V	B +	22	6,6	6								17		77	
338	11/157	V	O +	36	7,6	7								26	27	40	
339	11/158	V	O +	21	8,3	4										96	
340	11/159	V	B +	39	6,3	13							2	21	21	43	
341	11/160	H	A ₁ B+	46	6,3	13					5			26	26	30	
342	15/250	V	B ₁ +	37	5,9	15					6	6		12	12	49	
343	15/201	V	B +	54	6,5	19					13			25	21	22	
344	15/202	V	O +	38	7,0	8										92	
345	15/203	V	O +	32	6,9	3								12		84	
346	15/204	V	O +	26	7,0	2									46	52	
347	15/205	V	B +	35	7,1	11									30	59	
348	15/206	V	B +	37	6,8	10						7	7	7	20	59	
349	15/207	H	A ₁ B+	34	7,2	7										93	
350	15/208	V	A ₁ B+	34	6,2	10								5		85	
351	15/209	V	B ₁ -	25	6,6	8									46	46	
352	15/210	V	A ₂ B+	33	6,4	8										92	
353	15/211	V	B ₂ +	33	5,3	13										87	
354	15/212	V	B -	26	6,6	8	4						18	11	12	47	
355	15/213	V	B -	30	5,2	12								22	33	33	
356	1/25	V	A ₁ B+	21	5,4	5										95	
357	1/26	V	B ₁ +	33	6,0	4						8	8	16	16	38	
358	1/27	V	A ₂ B+	36	5,8	6						5		17	18	54	
359	1/28	H	B ₂ +	21	7,5	7					10			24	29	30	
360	1/29	V	A ₂ B+	31	6,8	13	7									80	
361	1/30	H	B ₂ +	34	6,5	12										88	
362	1/31	V	B +	53	7,0	10						16		16	17	41	
363	1/32	H	A ₂ B+	34	5,0	12						11		25	26	26	

SUEROS NORMALES

N°	Identf.	Sexo	Grupo Edad Sang.	A.F. Dist U.I. cm.	% activ.	fosf. y posición banda en el gel													
						0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100			
364	1/33	H	B +	20	6,5	11						7	7	28		47			
365	1/34	V	A ₂ B+	33	6,5	15									30	55			
366	1/35	V	A ₂ B+	28	5,9	12										88			
367	1/36	V	B ¹ -	33	6,3	8						19	19	11		43			
368	1/37	V	A ₁ +	33	5,8	8										92			
369	10/200	V	A ₁ +	25	5,5	8										92			
370	10/201	V	B ¹ +	47	6,2	8								19	35	38			
371	10/222	H	B +	53	6,5	11									45	44			
372	10/223	H	B +	40	6,7	8		5		10	10			27	19	21			
373	10/233	V	A ₁ +	32	6,8	4										96			
374	10/350	V	A ₁ +	20	6,1	10								7		83			
375	10/351	V	O ¹ -	43	6,1	8			1			12	12	15	16	36			
376	10/352	H	B +	33	6,3	5										95			
377	10/353	H	A ₁ B+	23	5,0	6										94			
378	10/354	H	B ¹ +	23	5,8	1										99			
379	15/50	V	A ₁ B-	46	6,0	8										92			
380	15/51	V	B ¹ -	58	5,9	17							27	25	15	16			
381	15/52	V	A ₁ B+	39	5,8	13						5		30		52			
382	15/53	V	A ₁ B-	36	6,0	12		5							45	38			
383	15/54	V	B ² -	29	4,7	10						5				85			
384	15/55	H	A ₁ B+	29	5,6	5										95			
385	15/56	V	B ¹ +	41	5,7	10									30	60			
386	15/57	H	A ₁ B+	36	5,2	10									30	60			
387	15/58	H	A ₁ B+	50	6,4	5								5	30	60			
388	15/59	V	B ¹ -	56	6,0	10									30	60			
389	15/60	H	B +	32	6,0	5										95			
390	15/61	H	B -	44	7,0	16									35	50			
391	15/62	H	B -	26	6,9	5										95			
392	15/63	H	A ₂ B+	38	5,9	10							2			88			
393	20/ 2	H	A ₁ B+	24	6,9	5							6	6		83			

SUEROS NORMALES

=====

N°	Identf.	Sexo	Grupo Sang.	A.F.Dist U.I. cm.	%activ. fosf. y posición banda en el gel													
					0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100			
394	20/ 3	H	B +	38	6,6	8						6	6	10	30	40		
395	20/ 4	H	B +	24	7,0	6						34		14	15	31		
396	20/ 5	H	B -	29	6,8	5						2				93		
397	20/ 6	V	B +	27	5,9	6			11	11	11			15	16	30		
398	20/ 7	H	B +	30	6,6	7			8	9				11	12	53		
399	20/ 8	V	B +	24	6,2	10			13	13				28		36		
400	20/ 9	V	B +	19	5,6	6									35	59		
401	20/10	V	B +	22	6,1	10	5		17	5	10			12		36		
402	20/11	V	B +	13	6,1	16				29		21			17	17		
403	20/12	V	B +	25	6,9	12					3				35	50		
404	20/13	V	B +	34	6,3	11					25				24	40		
405	21/30	V	B +	18	6,2	10									41	49		
406	21/31	V	B +	32	6,6	8				4				20	29	39		
407	21/32	V	B +	38	6,6	10				25				26	19	20		
408	21/33	V	B +	22	5,6	13									35	52		
409	21/34	V	B +	36	7,1	6					20			16	17	41		
410	21/35	V	B -	27	6,5	14					2			10	31	43		
411	21/36	V	A ₁ B+	22	5,4	13										87		
412	21/37	V	A ₁ B+	25	6,7	13		7								80		
413	21/38	V	A ₁ B+	14	7,0	12								18	24	46		
414	21/39	V	A ₁ B+	39	6,7	15									29	56		
415	21/40	V	A ₁ B+	34	7,0	21								19	25	35		
416	17/150	V	B ⁺	18	6,6	10					15					71		
417	17/151	V	B +	17	6,4	12										88		
418	17/152	V	B +	25	6,0	5					8			17		70		
419	17/153	H	B -	13	6,6	7										93		
420	17/154	V	B +	26	6,9	7								14		80		
421	17/155	H	A ₁ B+	25	5,4	6									16	77		
422	17/156	V	B ⁺	26	6,9	7										93		
423	17/157	V	A ₁ B+	25	6,5	13		1								86		

SUEROS NORMALES

N°	Identf.	Sexo	Grupo Edad Sang.	A.F.Dist U.I. cm.	% activ. fosf. y posición banda en el gel										gel
					0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
424	17/158	V	A ₂ B-	21	6,4	22								8	70
425	17/159	V	A ₂ B+	14	6,5	14									86
426	17/160	V	A ₂ B+	18	4,4	8									92
427	19/ 1	V		35	6,6	16		2			7			19	54
428	19/ 2	V	B +	24	5,4	17		2							78
429	19/ 3	V	B +	14	7,1	9									91
430	19/ 4	V	B +	25	6,9	22						2			76
431	19/ 5	V	B +	22	7,4	24						2		16	58
432	19/ 6	H	A ₁ B-	11	7,2	3									97
433	19/ 7	H	A ₁ B+	14	7,0	3									97
434	19/ 8	V	A ₁ B+	22	7,6	7								42	51
435	19/ 9	V	A ₁ B+	21	6,2	6								50	44
436	19/10	H	A ₁ B+	14	6,9	4									96
437	19/11	V	A ₁ B+	17	6,2	4									96
438	19/12	V	B ¹ +	20	7,1	3									97
439	25/20	V	B -	18	6,8	2									98
440	25/21	V	B +	14	7,0	7								45	49
441	25/22	V	B +	17	6,6	7								37	55
442	25/23	V	B +	26	6,8	2									98
443	25/24	H	B +	18	6,9	4								43	53
444	25/25	V	B +	24	8,1	8						7			85
445	25/26	V	B +	28	6,6	6								29	65
446	3/180	H	B +	15	6,8	8				5		10		30	47
447	3/181	V	B -	28	6,3	5				12	10				74
448	3/182	H	B +	26	6,4	3					3			32	62
449	3/183	V	B +	20	6,1	6					17				79
450	3/184	H	B -	17	6,6	5								44	52
451	3/185	V	B +	29	6,6	5									95
452	3/186	H	B +	16	6,9	5									95

SUEROS NORMALES

=====

N°	Identf.	Sexo Edad	Grupo Sang.	A.F.Dist U.I. cm.	% activ. fosf. y posición banda en el gel															
					0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100					
453	3/187	V	B -	15	6,7	3														97
454	3/188	V	A ₁ B+	15	6,2	5								3	30					62
455	3/189	V	A ₁ B-	16	7,1	5														95
456	3/190	V	A ₁ B+	16	6,5	6														94
457	7/150	V	B ₁ +	21	6,5	8					3		10	38						42
458	7/151	V	B +	19	7,3	4				2	2	2	14	30						46
459	7/152	H	B -	21	7,1	4					7	5	15	17						52
460	7/153	V	B +	19	7,6	12									33					54
461	7/154	V	B +	18	6,8	4									36					60
462	7/155	V	A ₁ B+	18	6,3	4									45					51
463	7/156	H	A ₁ B+	24	5,6	2														98
464	7/157	V	A ₁ B+	14	5,3	5														95
465	7/158	V	A ₁ B+	15	5,4	5														95
466	7/159	V	A ₁ B+	17	6,2	4						3		44						49
467	7/160	V	A ₁ B+	27	6,2	3														97
468	11/200	V	A ₁ B-	13	7,5	2														98
469	11/201	V	A ₁ B+	20	4,7	2														98
470	11/202	V	A ₁ B+	29	7,1	2														98
471	11/203	V	A ₂ B+	19	5,2	2														98
472	11/204	V	A ₂ B+	18	4,9	2														98
473	11/205	V	A ₂ B-	13	5,6	2														98
474	11/206	V	A ₂ B+	19	5,8	3														97
475	11/207	V	B ₁ -	28	5,3	2							20	39						39
476	11/230	V	B -	37	8,6	2														98
477	11/231	V	B +	20	5,4	3				5										92
478	11/232	H	O +	30	5,2	10	5		7				22							56
479	11/233	H	A ₁ B+	24	5,6	3														97
480	11/234	V	A ₁ +	25	6,4	2														98
481	11/235	V	A ₂ +	36	5,8	13														87

SUEROS NORMALES

N°	Identf.	Sexo	Grupo Edad Sang.	A.F.Dist U.I. cm.	%activ. fosf. y posición banda en el gel											
					0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
482	11/236	V	A ₂ -	20	5,5	7										93
483	11/50	V	A ₂ +	29	6,9	11							16	30		44
484	20/51	V	A ₁ +	31	6,3	7									46	47
485	20/52	H	A ₁ -	20	6,6	4									34	62
486	20/53	H	A ₂ B+	27	4,2	4										96
487	20/54	V	A ₂ B+	24	4,9	8										92
488	20/55	H	A ₁ B+	42	4,0	2										98
489	20/56	H	A ₁ B+	30	4,0	3										97
490	20/57	V	A ₁ B+	31	3,9	3										97
491	20/58	V	A ₁ B+	21	5,8	4										96
492	20/59	V	A ₁ B+	36	4,1	2										98
493	20/60	V	A ₂ B-	17	5,9	2								2		96
494	27/ 2	H	A ₂ B+	15	4,6	8	1							2		89
495	27/ 3	H	A ₂ B+	16	5,8	7	1									92
496	27/ 4	V	A ₁ B+	13	4,3	7										93
497	27/ 5	H	A ₂ B+	24	5,5	8		8								84
498	27/ 6	H	A ₂ B+	18	4,2	5										95
499	27/ 7	H	A ₂ B+	15	6,4	5				10				35	25	25
500	27/ 8	V	A ₂ B+	22	6,2	12										88
501	27/ 9	V	A ₁ B+	20	5,5	6										94
502	27/10	V	A ₁ B+	15	7,1	6										94
503	27/11	V	A ₁ B+	30	5,5	2										98
504	27/12	V	A ₂ B-	12	8,0	10									40	50
505	27/13	V	A ₂ B+	16	5,7	7										93
506	29/80	V	A ₁ B+	37	5,6	2										98
507	29/81	V	A ₁ B+	30	5,2	2										98
508	29/82	V	A ₁ B+	20	6,2	5						27				68
509	9/110	V	A ₁ B+	18	5,0	2										98
510	9/111	H	A ₂ B+	18	5,6	6										94

SUEROS NORMALES

=====

N°	Identf.	Sexo	Grupo	A.F.Dist	% activ. fosf. y posición banda en el gel											
		Edad	Sang.	U.I. cm.	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
511	9/112	H	B +	20	6,2	7								7		86
512	9/113	V	B +	30	6,5	14										77
513	9/114	H	B +	25	5,7	13										87
514	9/115	H	B +	24	5,9	5										95
515	9/116	V	B +	36	6,5	6										94
516	9/117	V	B +	28	6,3	2									37	61
517	12/30	V	A ₁ B+	13	5,7	4						4				92
518	12/31	V	A ₁ B+	12	4,7	2										98
519	12/32	V	A ₂ B+	9	5,6	3									49	48
520	12/33	V	A ₂ B+	21	7,8	9									34	57
521	12/34	H 35	A ₁	28	6,2	11			2				18			69
522	12/35	H	O +	26	5,2	8			1			5				61
523	12/36	V	A ₁ B+	27	5,2	5										95
524	12/37	V	B ₁ +	29	6,0	6							5		20	69
525	12/38	V	B +	35	7,2	3									49	48

ANEXO n° 2-a

SUEROS PATOLOGICOS: HEPATOPATIAS

=====

A.F. : Actividad Fosfatásica en U.I.

Dist.: Distancia recorrido en cm por la banda anódica

N°	Diagnóstico	Identf.	A.F.	Dist U.I. cm.	% activ. fosf. y posición banda en el gel															
					0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100					
1	Ict.Ostruc.	23/172	230	6,7	12	6	3						15	15	49					
2	Ict.Ostruc.	16/199	105	5,8	31			5						16	48					
3	Ict.Ostruc.	1/76	66	7,5	19								19	12	50					
4	Ict.Ostruc.	19/50	73	6,5	11								35		54					
5	Cirrosis.	14/168	39	6,2	6								20	21	53					
6	Ict.Ostruc.	9/65	83	4,6	23							3		40	34					
7	Ict.Ostruc.	29/126	124	6,7	24		11							36	29					
8	Ict.Ostruc.	27/11	107	6,6	14										86					
9	Cirrosis.	19/63	52	6,5	3					10	10			32	45					
10	Ict.Ostruc.	4/119	56	6,0	14									21	65					
11	Cirrosis.	4/172	117	6,3	2					1				45	52					
12	Ict.Ostruc.	10/50	335	6,4	26		23						6	11	34					
13	Cirrosis.	2/10	17	4,1	4										96					
14	Ict.Ostruc.	22/132	421	6,8	46			12			2	3		19	19					
15	Ict.Ostruc.	29/147	93	6,2	12									29	59					
16	Ict.Ostruc.	29/186	199	6,7	38		12					7		9	34					
17	Ict.Ostruc.	29/150	150	5,9	14		9					9		25	43					
18	Ict.Ostruc.	27/184	235	5,6	18							14		32	36					
19	Ict.Ostruc.	25/146	459	5,2	32		14					11	5		38					
20	Ict.Ostruc.	1/109	216	6,9	35		7					4	14	15	25					
21	Ict.Ostruc.	1/135	169	7,7	30		9						15	20	26					
22	Ict.Ostruc.	15/170	195	6,6	25		8					3	3	4	57					
23	Ict.Ostruc.	14/130	110	6,1	19						4	15	16	20	26					
24	Cirrosis.	28/163	48	7,0	12							4		25	59					
25	Ict.Ostruc.	23/120	102	6,8	38								8	14	40					

SUEROS PATOLÓGICOS: HEPATOPATIAS

=====

N°	Diagnóstico	Identif.	A.F. Dist U.I. cm.	% activ. fosf. y posición banda en el gel										
				0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
26	Ict.Ostruc.	17/229	77 6,6	20									3 29	48
27	Ict.Ostruc.	26/189	268 5,9	34	4				5	7			6	45
28	Ict.Ostruc.	26/174	333 6,0	41		10							3	46
29	Ict.Ostruc.	1/156	459 6,7	38	8			7					7	40
30	Ict.Ostruc.	1/203	53 6,7	23				11					4	16
31	Cirrosis.	11/24	57 5,3	16							4		30	50
32	Ict.Ostruc.	29/130	380 7,3	34									5 10	51
33	Cirrosis.	28/99	94 7,1	14									16 20	50
34	Ict.Ostruc.	14/147	210 6,0	30	2					4	17	21		26
35	Cirrosis.	14/107	82 6,0	20									24	56
36	Cirrosis.	4/123	50 6,0	14										86
37	Cirrosis.	4/148	158 5,7	3									47	50
38	Ict.Ostruc.	22/78	360 6,2	33		2			3		2	30		30
39	Ict.Ostruc.	23/152	431 6,3	36	6		6				5	5		42
40	Ict.Ostruc.	1/160	458 6,5	40	9						9		7	33
41	Cirrosis.	22/83	162 6,4	8		3					8		43	38
42	Cirrosis.	27/85	52 6,3	5		2					6		37	50
43	Cirrosis.	31/81	24 5,3	7		1		1						91
44	Ict.Ostruc.	31/143	123 5,6	30		10					5	5		50
45	Cirrosis.	8/23	43 6,5	8		10					9	7	52	16
46	Cirrosis.	25/136	50 4,5	16		12	14					8		50
47	Cirrosis.	25/153	102 5,4	25		2					6			67
48	Cirrosis.	1/43	33 7,0	9									46	47
49	Cirrosis.	29/131	60 5,6	13		4				13			34	36
50	Cirrosis.	29/119	43 5,5	17									62	21
51	Cirrosis.	17/137	36 7,6	9									52	39
52	Cirrosis.	31/201	39 5,8	23		9			6		5		15	42
53	Cirrosis.	25/143	170 5,3	31									13	56
54	Cirrosis.	31/261	111 8,7	28	10	10	10				5	11	6	20
55	Cirrosis.	1/33	36 6,6	16									42	42
56	Cirrosis.	31/160	33 6,2	10										90

SUEROS PATOLOGICOS: HEPATOPATIAS

=====

N°	Diagnóstico	Identif.	A.F.Dist		% activ. fosf. y posición banda en el gel												
			U.I.	cm.	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100		
57	Cirrosis.	31/212	65	5,5	19		2										79
58	Cirrosis.	8/392	170	6,5	25		4					29			11		31
59	Cirrosis.	8/404	130	5,9	19		2								40		39
60	Cirrosis.	8/50	120	6,5	14												86
61	Cirrosis.	10/72	67	6,6	9		6				13	13	14	14			31
62	Cirrosis.	10/234	120	6,5	14		13	10				9			25		29
63	Cirrosis.	1/160	22	5,9	8		1							2	48		41
64	Cirrosis.	31/219	20	6,2	31		6										63
65	Ict.Ostruc.	25/61	366	5,0	27		13					5			25		30
66	Cirrosis.	23/110	90	5,2	32												62
67	Hepatitis.	16/248	16	6,3	10											25	65
68	Hepatitis.	26/5	44	6,9	7			2						4	45		42
69	Ict.Ostruc.	17/202	216	5,7	31			6							8		55
70	Ict.Ostruc.	17/161	118	6,5	40										5	15	40
71	Ict.Ostruc.	17/108	147	6,7	40								3	17	20		20
72	Cirrosis.	31/4	52	5,2	9	1				2							88
73	Cirrosis.	31/8	48	6,3	13	2									29	20	35
74	Ict.Ostruc.	8/247	125	6,4	24	3										25	48
75	Hepatitis.	29/137	22	7,4	13												88
76	Hepatitis.	28/207	85	6,9	7							3				45	45
77	Hepatitis.	28/250	45	6,9	9											21	70
78	Hepatitis.	1/190	103	5,2	4	6				22						34	34
79	Hepatitis.	25/38	49	4,6	9	5									43		43
80	Hepatitis.	25/168	100	4,0	16								4			40	40
81	Hepatitis.	25/212	42	4,4	20		5			15							60
82	Hepatitis.	23/162	46	6,1	20		3										77
83	Ict.Ostruc.	1/123	149	7,0	32		15						12			10	30
84	Cirrosis.	1/103	38	6,3	15										6	38	41
85	Cirrosis.	2/49	83	4,5	12										31		57
86	Cirrosis.	27/138	82	5,5	13										32	14	40
87	Cirrosis.	27/209	83	4,7	12	8									13	31	36

SUEROS PATOLOGICOS: HEPATOPATIAS
=====

N°	Diagnóstico	Identif.	A.F.Dist U.I. cm.	% activ. fosf. y posición banda en el gel										
				0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
88	Cirrosis.	27/232	34 6,7	6									28	67
89	Cirrosis.	16/370	221 6,2	17								5	33	45
90	Cirrosis.	8/113	107 5,7	26		4								70
91	Hepatitis.	8/106	82 6,3	16									29	55
92	Cirrosis.	3/221	24 6,7	16										84
93	Ict.Ostruc.	28/193	300 7,6	8							25	20	17	30
94	Ict.Ostruc.	4/171	146 6,1	13									48	39
95	Ict.Ostruc.	17/170	516 6,6	30								10	14	46
96	Ict.Ostruc.	1/108	220 7,2	40		8					4		13	35
97	Cirr. hep.	29/131	51 6,2	10							10		25	55
98	Cirr. hep.	29/119	50 6,8	5									39	56
99	Ict.Ostruc.	27/135	105 7,2	39								5	25	31
100	Ict.Ostruc.	27/178	236 6,1	16		8							56	20
101	Ict.Ostruc.	27/149	480 6,1	32		6			7			9	27	19
102	Hepatitis.	A.M.P.	143 6,8	6									29	65
103	Cirrosis.	3/38	19 5,7	4										96
104	Hepatitis.	3/40	100 7,3	2										98
105	Hepatitis.	3/229	54 5,2	5										95
106	Hepatitis.	3/391	64 7,7	6										94
107	Ict.Ostruc.	3/113	187 7,3	6									5	89
108	Ict.Ostruc.	3/206	214 7,0	10									60	30
109	Hepatitis.	5/146	66 7,1	15										85
110	Hepatitis.	5/193	49 7,8	12									30	58
111	Cirrosis.	5/137	41 8,2	1										99
112	Cirrosis.	5/60	53 8,4	1									46	53
113	Hepatitis.	5/42	28 5,5	8										92
114	Hepatitis.	5/175	47 5,4	12										88
115	Hepatitis.	5/353	81 7,9	2							1		4	93
116	Hepatitis.	5/381	41 7,8	5										95
117	Cirrosis.	29/251	113 7,9	12										88
118	Ict.Ostruc.	29/278	150 4,3	29		6					11			54

THE UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS

N°	Diagnóstico	Identif.	A.F. Dist		% activ. fosf. y posición banda en el gel											
			U.I.	cm.	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
119	Cirrosis.	16/184	110	6,0	18	9		2							30	41
120	Cirrosis.	16/110	81	7,7	5									3	60	34
121	Ict.Ostruc.	9/150	197	8,8	20									6	50	20
122	Ict.Ostruc.	9/110	168	8,4	27								7	27	20	19
123	Cirrosis.	9/121	98	7,4	2								5	13	43	37
124	Cirrosis.	30/100	71	7,4	19									14		67

SUEROS PATOLOGICOS: OSTEOPATIAS

=====

A.F. : Actividad Fosfatásica

Dist.: Distancia recorrido en cm por la banda anódica

N°	Diagnóstico	Identif.	A.F. Dist U.I. cm.	% activ. fosf. y posición banda en el gel											
				0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
1	Paget	7/38	702	6,5	7		3			13					77
2	Art.Cer.Lum.	1/87	32	6,7	9								28		63
3	Paget	22/49	40	7,2	8		3						50		39
4	Paget	2/286	387	4,6	7								43		50
5	Escoliosis	17/61	140	6,0	5								37		38
6	Paget	3/229	201	8,9	3								57		40
7	Paget	26/29	401	8,0	3							7	60		30
8	Paget	26/31	700	5,9	10								60		30
9	Paget	5/51	74	7,0	5		7	5					50		33
10	Paget	2/71	391	4,8	7		2			12			51		28
11	Hipoparat.	3/353	129	7,5	12					7			31		50
12	Hipoparat.	25/154	134	7,3	10					7			58		25
13	Hipoparat.	25/154	121	4,8	6		5		20	12			26		31
14	Paget	29/47	268	7,3	6				2	2		12	27		50
15	Paget	29/29	41	6,3	3							26	44		27
16	Paget	12/31	540	6,8	6		12			12			56		14
17	Paget	5/65	338	6,6	7								72		21
18	Hipofosf.fam. congénita.	4/17	41	6,3	10		2						54		34
19	Hipofosf.fam. congénita.	11/46	34	6,5	5								35		60
20	Hipofosf.fam. congénita.	11/69	51	6,9	5							18	42		35
21	Hipofosf.fam. congénita.	4/116	102	5,5	5		3					23	38		31
22	Hipofosf.fam. congénita.	10/107	105	5,5	4					9	9	10	36		32

ANEXO N° 2-b

SUEROS NORMALES: NIÑOS

A.F.: Actividad fosfatásica en U.I.

Dist.: Distancia recorrido por la banda anódica en cm.

N°	Identif.	Edad	A.F. U.I.	Dist. cm.	% activ. fosf. y posición en el gel	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1	126	7 años	119	6,9	6										57	37
2	125	2 "	111	6,9	3											97
3	122	10 "	40	7,4	4										64	33
4	120	14 "	40	7,1	1										56	43
5	113	14 "	191	7,8	2										69	29
6	107	7 "	106	8,0	2										66	32
7	91	14 "	91	7,2	5										62	33
8	20	8 "	91	8,9	2										78	20
9	15	14 "	135	8,1	6										32	62
10	4	8 "	54	6,9	3											97
11	79	9 "	113	5,9	3										59	38
12	76	12 "	96	5,5	4							4			69	23
13	67	13 "	135	7,5	1						3				64	32
14	103	12 "	152	7,1	2										53	45
15	88	8 "	57	5,5	6										67	26
16	93	8 "	114	7,3	5							2			53	40

SUEROS PATOLOGICOS: PANCREATITIS

=====

A.F. : Actividad fosfatásica en U.I.

Dist.: Distancia recorrido en cm por la banda anódica

N° Diagnóstico	Identif.	A.F.	Dist.	% activ. fosf. y posición banda en el gel															
				U.I.	cm.	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100			
1 Pancreatitis	8/124	49	6,7	14											36	50			
2 Pancreatitis	8/168	55	6,4	25											20	53			
3 Pancreatitis	8/170	42	6,3	15												70			
4 Pancreatitis	8/132	69	5,9	13											42	45			
5 Pancreatitis	8/127	76	6,0	27										7	23	41			
6 Pancreatitis	9/122	121	7,1	17								2	5	16	26	33			
7 Pancreatitis	14/334	157	5,4	15												85			
8 Pancreatitis	14/137	67	6,1	4												96			
9 Pancreatitis	15/7	52	5,9	11											39	50			
10 Pancreatitis	10/64	45	6,1	9									1		32	58			
11 Pancreatitis	1/37	25	5,2	13								2		53		42			
12 Pancreatitis	1/133	46	8,2	6										14	36	64			
13 Pancreatitis	1/132	33	6,9	13										17		66			
14 Pancreatitis	25/193	20	5,0	8												85			
15 Pancreatitis	24/41	22	5,8	14								3		2	4	75			
16 Pancreatitis	24/102	40	7,4	14										10	50	22			
17 Pancreatitis	24/179	93	6,9	23										6		61			
18 Pancreatitis	24/77	19	6,7	16										5	8	63			
19 Pancreatitis	30/62 E.M.	127	7,1	32											3	62			
20 Pancreatitis	22/194 M.L.F	18	6,9	10												90			
21 Pancreatitis	22/197 J.J.	42	7,2	13												80			
22 Pancreatitis	22/181 V.G.	59	6,0	9									6			85			
23 Pancreatitis	22/72	52	8,1	12											18	71			

ANEXO n° 2-d

SUEROS PATOLOGICOS: NEFROPATIAS

A.F. : Actividad fosfatásica en U.I.

Dist.: Distancia recorrido por la banda anódica en cm.

N° Diagnóstico	Ident.	Sexo	A.F. Dist.		% activ. fosf. y posición banda en el gel														
			U.I.	cm.		0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100			
1 Pielonefri.	26/198	H	69	6,8	14			5	4						21	56			
2 I.R.C.	26/48	V	28	5,6	13														87
3 I.R.C.	1/71	V	45	7,0	6				3	2				20	29	40			
4 Lit. Renal	1/59	V	35	7,2	7										39	54			
5 I.R.C.	A.M.S.	V A+	23	5,8	19														81
6 I.R.C.	A.M.R.	H 0+	87	6,5	19										31	50			
7 I.R.C.	M.A.	V A-	39	5,6	12				2										86
8 I.R.C.	C.T.	H 0+	24	6,9	16									9	20	46			
9 I.R.C.	C.T.	V	80	6,6	18										32	50			
10 I.R.C.	A.M.	V A-	30	5,6	16														84
11 I.R.C.	I.C.	V	27	5,7	19														81
12 I.R.C.	I.M.	V A+	67	5,6	18				7										75
13 I.R.C.	R.H.	V	16	6,6	8														92
14 I.R.C.	B.V.	H 0+	42	5,3	10				2					13	25	50			
15 I.R.C.	J.L.	V	14	5,5	9				5						26	60			
16 I.R.C.	J.C.V.	V	32	5,2	14				7										79
17 I.R.C.	M.R.	H 0+	15	4,7	30														70
18 I.R.C.	J.C.	H 0-	72	5,1	9			4						17	22	68			
19 I.R.C.	E.L.	V	17	5,2	25														75
20 I.R.C.	M.V.E.	H 0+	220	5,6	8			3				7		7		75			
21 I.R.C.	A.D.	V	41	5,2	10														90
22 I.R.C.	A.D.C.	V A+	33	5,2	13			1				1							85
23 I.R.C.	M.J.	H B+	28	5,3	15			3						14	23	45			
24 I.R.C.	P.M.	V A+	16	4,5	10														90
25 I.R.C.	J.J.M.	V A+	26	4,7	4										36	60			
26 I.R.C.	P.M.	H 0+	120	5,4	5			2				13			30	50			

SUEROS PATOLOGICOS: NEFROPATIAS

N° Diagnóstico	Ident.	Sexo	A.F. Dist	U.I. cm.	% activ. fosf. y posición banda en el gel															
					0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100					
27 I.R.C.	J.I.	V	46	4,6	9															88
28 I.R.C.	L.S.A.	V A-	20	6,0	19															50
29 I.R.C.	J.C.	V A+	12	5,8	5															48
30 I.R.C.	E.M.	H B+	24	5,7	7															50
31 I.R.C.	M.C.	H A+	17	5,3	18															82
32 I.R.C.	A.C.	V 0+	19	5,9	20															52
33 I.R.C.	E.S.	V 0+	24	5,8	16															50
34 I.R.C.	C.L.	H 0+	22	6,2	9															91
35 I.R.C.	F.J.	H	33	5,5	16															57
36 I.R.C.	A.A.	V	30	5,9	9															50
37 I.R.C.	J.J.D.	V 0+	24	5,4	4															50
38 I.R.C.	J.C.	H	52	7,6	18															64
39 I.R.C.	M.N.A.	H	175	6,7	9															43
40 I.R.C.	M.R.	V	35	5,9	4															68
41 I.R.C.	E.M.	H	50	5,5	3															67
42 I.R.C.	C.L.	H	47	6,3	9															56
43 I.R.C.	A.M.	H	111	6,1	2															43
44 I.R.C.	F.J.	H	57	4,7	6															55
45 Trans.Renal	A.Y.D.	V	37	6,8	14															46
46 I.R.C.	R.H.	V	26	5,7	8															55
47 Glomerulo	J.C.H.	V	30	4,9	3															97
48 I.R.C.	L.D.	V	133	6,1	34															30
49 I.R.C.	A.J.	H	55	6,8	25															20
50 I.R.C.	J.M.A.	V	51	6,9	8															54
51 I.R.C.	R.V.	V	56	6,4	10															31
52 I.R.C.	A.M.S.	V	31	5,9	3															61
53 I.R.C.	C.F.	V	41	6,4	4															96
54 I.R.C.	M.A.G.	V	85	5,9	14															44
55 I.R.C.	M.R.H.	H	72	7,0	19															37
56 I.R.C.	M.V.E.	H	42	5,9	3															40
57 I.R.C.	E.D.A.	H	51	7,5	1															65

SUEROS PATOLOGICOS: NEFROPATIAS

=====

N°	Diagnóstico	Ident.	Sexo	A.F. Dist		% activ. fosf. y posición banda en el gel													
				U.I.	cm.	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100			
58	I.R.C.	J.M.V.	V	111	5,6	9		2					8		45	36			
59	I.R.C.	C.T.	V	28	6,5	7								20	22	51			
60	I.R.C.	P.M.	H	45	6,4	9									33	58			
61	I.R.C.	J.C.D.	H	113	5,5	6			2						30	62			
62	I.R.C.	C.T.	V	49	6,3	14									37	49			
63	I.R.C.	J.C.V.	V	15	6,1	8									39	53			
64	I.R.C.	M.L.D.	H	44	8,1	28	3							10	29	30			
65	Trans.Renal	M.D.T.	H	26	6,3	9									38	53			
66	Frac.Re.Agu.	A.R.R.	V	84	7,7	13		7				9		23	18	30			
67	Glomerulo	A.S.F.	V	29	6,7	11									34	55			
68	I.R.C.	J.R.	H	39	5,4	20						2	2			76			
69	Glomerulo	A.Y.D.	V	29	6,0	26	2		2				10			60			
70	Glomerulo	J.C.H.	V	36	7,2	18										82			
71	I.R.C.	J.M.	V	53	7,8	5									63	32			
72	Trans.Renal	I.M.	V	39	6,0	19		2				3			52	24			
73	Pielonefrit.	R.G.C.	V	32	8,4	26	5						12		20	37			
74	I.R.C.	17/169		122	6,7	26							14		30	30			
75	Nefrectomia	8/18		37	6,1	2									60	38			
76	I.R.C.	8/14		25	6,3	14									50	36			
77	I.R.C.	28/228		84	6,6	7									43	56			
78	Trans.Renal	22/305		31	6,4	12									43	45			
79	Trans.Renal	28/304		44	6,3	21						9				71			
80	Trans.Renal	28/175		35	7,1	15							4		27	54			
81	I.R.C.	C.T.	V	18	6,5	11										89			
82	I.R.C.Fr.R.	28/174		257	6,2	19								31	25	25			
83	I.R.C.	F.J.	H	54	7,9	6								34	30	30			
84	I.R.C.	C.L.	H	77	7,1	4								12	34	50			
85	I.R.C.	A.M.	H	92	6,5	7					8	8	9		41	19			
86	I.R.C.	M.N.A.	H	25	7,0	3										97			
87	I.R.C.	E.D.	H	19	7,6	1										99			
88	I.R.C.	P.M.	V	18	5,9	2										98			

SUEROS PATOLOGICOS: NEFROPATIAS

=====

N°	Diagnóstico	Ident.	Sexo	A.F.	Dist	U.I.	cm.	% activ. fosf. y posición banda en el gel											
								0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
89	I.R.C.	J.C.	H	25	4,7			1											99
90	I.R.C.	P.M.	H	43	8,1			9					5			52			34
91	I.R.C.	P.M.	H	65	8,1			5						25	20	27	10		13
92	I.R.C.	A.C.	V	47	8,2			10							2	23			65
93	I.R.C.	A.C.	V	37	6,9			5						7		36			51
94	I.R.C.	M.V.E.	H	49	6,5			4							1		61		34
95	I.R.C.	M.V.E.	H	96	6,1			10				9	7		7		31		36
96	I.R.C.	B.V.	H	46	7,1			6						8	7		49		30
97	I.R.C.	B.V.	H	38	6,8			6						24			40		30
98	I.R.C.	E.M.	H	33	6,7			5					5	8	27				55
99	I.R.C.	E.M.	H	36	5,6			3					7			32			58
100	I.R.C.	R.H.	V	29	6,2			3									31		66
101	I.R.C.	R.H.	V	35	5,1			3									52		45
102	I.R.C.	9/90		17	5,8			12							32		31		25
103	I.R.C.	E.M.	H	24	5,2			6		2					18		19		55
104	Nefrosis	C.R.S.	H	32	5,8			20							5				75
105	Trans.Renal	5/197		48	5,2			18											82
106	Sin.nefrót.	9/184		161	7,7			20							5		45		30
107	Glomerulo	4/24		190	7,4			8							5	22	32		32
108	I.R.C.	4/176		65	6,2			20		3				2	10	2			66
109	I.R.C.	31/275		148	7,8			1						3	14		56		25
110	I.R.C.	31/18		70	7,4			1								53			46
111	I.R.C.	4/385		135	7,4			1					2		14		39		44
112	Fraca.Re.Ag.	31/208		279	7,0			32		9					7		10		42
113	Fraca.Re.Ag.	25/8		650	8,1			17							5	60			18
114	I.R.C.	3/8		52	7,4			12								17			72
115	I.R.C.	3/77		73	7,0			19							18		35		29
116	Pielo.xanto.	3/354	H	36	7,1			10											90
117	Pielo.xanto.	3/393	H	35	7,8			15											85

ANEXO n° 2-e

SUEROS PATOLOGICOS: ALT. PULMONARES

A.F. : Actividad Fosfatásica en U.I.

Dist.: Distancia recorrido en cm. por la banda anódica

Nº	Diagnóstico	Identf.	A.F.	Dist	% actv. fosf. y posición banda en el gel													
					U.I.	cm.	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
1	Neumonía	V.G.F..	41	8,2	11												38	51
2	Tb.residu.	A.I.M.	28	5,5	8													92
3	Tb. residu.	M.G.G.	47	5,4	12													88
4	Ins. resp.	G.B.C.	110	6,0	18	5	2										30	41
5	B.O.E.-I.R.	A.S.G.	45	6,5	13													87
6	Neumonía	L.S.M.	121	6,4	40										4	24	34	
7	Embolis. Pulm	A.S.G.	41	6,1	17												33.	51
8	B.O.E.-CorPul	A.S.G.	45	7,1	32										6	25	37	
9	B.Q.E.	H.A.G.	56	8,1	23												34	43
10	Neumonía	A.B.S.	138	7,3	33												18	49
11	Asma Intrin.	J.B.M.	63	8,1	1	25				2							6	67
12	Asma Intrin.	A.I.C.	52	6,8	4													96
13	Tuberculos.	A.P.J.	50	6,5	2										7		45	45
14	Insuf. resp.	E.C.R.	94	7,6	24	4	1											71
15	B.O.E.	M.C.L.	48	8,5	1	10				8							19	63
16	Tub. -Sil.	M.G.G.	81	7,7	5										4		60	32
17	Insuf. resp.	L.P.B.	58	7,2	1	28	6										34	32

SUEROS PATOLOGICOS: ALT. PULMONARES

A.F. : Actividad Fosfatásica en U.I.

Dist.: Distancia recorrido en cm. por la banda anódica

Nº	Diagnóstico	Identf.	A.F.	Dist	% actv. fosf. y posición banda en el gel										
			U.I.	cm.	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
18	Insuf. res.	G.B.C.	101	6,5	1	23	5							34	38
19	Neumonía	F.M.G.	44	4,6	23	3								40	34
20	B.O.C.	A.B.C.	58	6,9	1	19								35	46
21	Asma Intrin.	I.A.G.	66	6,2	1									57	42
22	Neumot.	A.R.H.	57	7,0	8										92
23	Onsuf. resp.	J.A.F.	49	5,6	21		2							39	38
24	Insuf. resp.	P.G.T.	68	6,9	34							3	4	18	41
25	Insuf. resp.	S.C.C.	77	5,1	26	3					3	7		20	40
26	Neumonía	P.A.H.	70	5,9		16								50	33
27	Broncoesp.	J.D.F.	95	4,5		5	7							51	36
28	B.O.C.	A.P.C.	55	4,6		4								39	57
29	Tub. pleur.	F.B.A.	66	6,2	7									56	37
30	Bronquiect.	F.Q.S.	50	5,4	10									44	46
31	Tuberculos.	L.C.L.	47	5,6	3								9	38	50
32	Tub. pulm.	S.C.O.	50	6,3	20									27	53
33	Ins, res ag.	S.A.O.	79	5,9	11		5								84
34	Tubercul.	L.C.L.	47	7,8	3								7	39	51

ANEXO nº 2-e

SUEROS PATOLOGICOS: ALT. PULMONARES

A.F. : Actividad fosfatásica en U.I.

Dist.: Distancia recorrido en cm. por la banda anódica.

Nº	Diagnóstico	Identif.	A.F.	Dist.	% actv. fosf. y posición banda en el gel											
					U.I.	cm.	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
35	B.O.C.	J.B.C.	50	5,2	11										21	68
36	Neumonía	P.A.H.	147	6,7	40							3	17	20	20	
37	B.O.C.	E.S.P.	64	6,9	8									10	82	
38	Emb. Pulmo.	J.M.F.	57	7,9	6									35	59	
39	B.O.C.	C.A.F.	56	5,6	20											80
40	Túb-Silic.	J.A.A.	52	8,0	10								10	30	50	
41	Insuf. resp.	A.G.M.	51	7,9	17									14	69	
42	B.O.C.	J.R.M.	48	7,6	9							19			72	
43	Emb. pulm.	V.G.J.	46	6,5	6									26	68	
44	Cor pulm.D.P.	E.S.P.	61	6,7	26	2						3	5	11	53	
45	Insuf. resp.	H.A.G.	56	6,8	22								5	29	44	

SUEROS PATOLOGICOS: CANCER

=====

A.F. : Actividad Fosfatásica en U.I.

Dist.: Distancia recorrido por la banda anódica en cm.

N°	Localización Diagnóstico	Identif.	sexo	A.F.	Dist	% activ. fosf. y posición banda en el gel												
						U.I.	cm.	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1	Ca.Hepático	10/153		76	5,8	7											41	52
2	Ca.Hepático	Marciana	H	52	6,4	27				3							35	35
3	Ca.Hepático	17/162		109	6,8	19										10	35	36
4	Ca.Hepático	28/310		370	6,5	6										4	16	74
5	Ca.Hepático	28/112		241	5,6	40				9	3		2			7		39
6	Ca.Vesical	8/112		66	6,0	6							16				36	42
7	Ca.Vesical	1/120		43	8,6	12											46	42
8	Ca.Vesical	L.D.A.1/137	V 67	37	6,5	18				2							20	60
9	Histiocitosis	19/248	VA ₁ +	31	7,5	9		6			1							84
10	Sarcoma pier.	J.P16/207	VO ₁ +	40	7,0	2					5						3	90
11	Ca.Recto	M.D.A 1/158	H	44	6,0	7											49	49
12	Ca.Sigma.	8/219		95	5,5	5										4	10	37
13	Ca.Colon.	8/121		149	6,6	25				15						5	6	7
14	Ca.Colon.	F.M.8/128	V	31	6,8	29				8							16	16
15	Ca.Colon.	M.M.8/116	V	49	4,7	14												36
16	Ca.Gástrico	8/110		385	6,8	5										5	20	40
17	Ca.Gástrico	8/126		60	6,0	16		7									10	24
18	Ca.Gástrico	8/133		55	6,6	17												15
19	Ca.Gástrico	P.G.23/212	HA ₁ +	72	7,0	12		4	7									17
20	Ca. Gástrico	F.A.29/154	H B-	40	7,9	11						4	4					22
21	Ca.Gástrico	H.C.13/257	V 0+	58	7,3	28				5							3	22
22	Ca.Gástrico	29/145		53	6,9	16				1		6						10
23	Ca.Esófago	29/130		33	6,9	13				1						3		35
24	Ca.Esófago	L.D16/209	V	23	7,0	12		1	2									
25	Ca.Páncreas	27/158		187	5,5	16		4										

SUEROS PATOLOGICOS: CANCER

=====

N°	Localización Diagnóstico	Identif.	sexo	A.F.Dist U.I. cm.	% activ. fosf. y posición banda en el gel										
					0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
26	Ca. Páncreas	15/166		215 6,2 29										18	53
27	Ca. Páncreas	16/216		240 7,8 16	5							30		36	13
28	Ca. Pulmón	1/198		24 6,9 1									5	43	41
29	Ca. Pulmón	1/199		47 5,9 15			4							51	30
30	Ca. Pulmón	E.G.15/226		18 7,7 10	1									12	77
31	Ca. Pulmón	1/126		29 7,8 22			5						5	34	34
32	Ca. Pulmón	1/125		56 7,7 13	6				2					53	26
33	Ca. Pulmón	1/180	V 0+	47 6,4 24			11					3		31	31
34	Ca. Pulmón	19/249	V 0+	58 8,0 4					8				9	39	40
35	Ca. Mama	4/46	H	44 6,8 5										42	53
36	Ca. Mama	8/30	H	72 7,0 15										40	45
37	Ca. Mama	A.T.19/250	H	80 8,1 16									1	39	44
38	Ca. Mama	E.G.T 1/117	H	59 7,2 14										43	43
39	Ca. Mama	G.H. 2/205	H A ₁ +	20 8,6 5	2		4	11						28	50
40	Ca. Mama	A.M. 9/140	H	16 7,8 17										17	63
41	Ca. Mama	A.T.R.9/141	H 0-	42 7,6 27			5							20	49
42	Ca. Mama	M.R.18/209	H 0+	89 7,4 11			3				8	9		39	30
43	Ca. Mama	J.H.13/255	H	36 8,4 11										34	49
44	Ca. Mama	A.C. 2/206	H A ₁ +	44 6,8 8			2	2						34	56
45	Ca. Mama	L.G.19/242	H A ₁ +	72 7,6 20			7							38	35
46	Ca. Mama	S.C. 4/163	H 0±	94 6,0 31			1	12						27	29
47	Ca. próstata	4/65	V	41 6,2 16										42	42
48	Ca. próstata	10/175	V	22 7,3 28										55	27
49	Ca. próstata	10/168	V	263 7,2 19									2	19	60
50	Ca. próstata	27/186	V	33 6,3 5										39	56
51	Ca. próstata	29/2	V	59 7,5 2										58	40
52	Ca. próstata	16/182	V	366 5,8 5								15		40	40
53	Ca. próstata	16/172	V	195 5,9 15										40	45
54	Ca. próstata	J.F.8/380	V	28 5,8 14			10							28	48
55	Ca. próstata	1/250	V	30 4,9 18			25							26	27

SUEROS PATOLOGICOS: CANCER

=====

N°	Localización	Identif.	sexo	A.F.Dist	% activ.	fosf. y posición banda en el gel										
	Diagnóstico					edad	U.I. cm.	0	10	20	30	40	50	60	70	80
56	Ca.próstata	R.C.1/141	V	56	6,3	13									20	57
57	Ca.próstata	A.C13/256	V	17	6,2	8		1	2						18	70
58	Ca.próstata	R.L23/79	V 0-	67	7,4	19				6				2	38	35
59	Ca.pene	1/121	V	26	5,1	9									50	41
60	Ca.Broncogénico	4/155	V	63	6,1	12								27		61
61	Mieloma	C.C.1/119	H 43	458	6,8	24								12	43	21
62	Mieloma	26/232		25	7,2	4							2		52	40
63	Mieloma	8/232		59	6,3	14									51	35
64	Hodkin	1/140		70	7,0	6									40	54
65	Hodkin	E.L.13/254	V	58	7,4	17		2	2				2	15	37	27
66	Lonfoma Int.	28/109		105	7,4	27		2					2		9	60
67	Ca.Tiroides	J.F.9/150	V 0+	25	6,9	12							8		14	70
68	Ca.Tiroides	I.C.H19/241	H	61	6,4	8			3						41	48
69	Melanoma	M.N.R16/208	V A ₁ +	41	8,5	15			3						57	25
70	Ca.vesical	17/152	0 ¹ +	37	7,2	13	1						1	21		64
71	Ca.vesical	1/124		42	6,6	6									69	25
72	Ca.próstata	F.H.8/379		15	6,0	8									46	46
73	Ca.mama	J.C.R.8/278	H A ₁ +	44	6,9	24		7					1		11	57
74	Ca.gástrico	1/5		300	7,0	9									25	66
75	Ca.próstata	27/143		460	5,5	6										94
76	Mieloma	26/232		62	7,1	4									56	40
77	Ca.pulmón	26/45		50	6,8	21							7		28	44
78	Linfoma.Int.	6/234		116	8,8	15								13		72
79	Linfoma.Int.	10/45		126	7,2	22							6	20		52
80	Ca.Hepático	10/223		241	5,6	40			9	3		2		7		39
81	Mieloma	13/257	V 0+	58	7,3	28		5					3		22	42

ANEXO n° 3

MEZCLA DE SUEROS PATOLOGICOS

=====

N°	Diagnóstico	Identif.	A.F. U.I.	% activ. fosf. y posición banda en el gel										
				0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1	Paget		700	6		12						12	56	14
	Hepat-Biliar		134	34		6						2	8	50
	Mezcla 1/1		347	10	1					2		11	54	14
2	Paget		702	7		3				13				77
	1.R.C.		44	14										86
	Mezcla 1/1		793	10								12		78
3	Adeno-prosta.	23/7	82	4	10	4							45	37
	Paget	23/79	241	12	4					5			50	30
	Mezcla 1/1		138	18		5						4	42	30
4	Bron.Obstr.CrÓ.	23/49	97	25	1	1				2			50	21
	Paget	23/79	241	12	4					5			50	30
	Mezcla 1/1		166	16	4								56	23
5	Neopla.gástri.	23/89	616	30		2						55		12
	Paget	23/79	241	12	4					5			50	30
	Mezcla 1/1		549	19	6								48	30
6	Cardio.congé.	23/147	95	43	2								32	22
	Paget	23/79	241	12	4					5			50	30
	Mezcla 1/1		200	36	3								40	19
7	Linfoma.	23/196	209	42									31	26
	Paget	23/79	241	12	4					5			50	30

MEZCLA DE SUEROS PATOLOGICOS

N°	Diagnóstico	Identif.	A.F. U.I.	% activ. fosf. y posición banda en el gel									
				0	10	20	30	40	50	60	70	80	90 100
8	Mieloma	23/200	145	48									51
	Paget	23/79	241	12	4					5		50	30
	Mezcla 1/1		206	26								53	21
9	Bron.obstr.Cr6.	23/309	134	9								67	25
	Paget	23/79	241	12	4					5		50	30
	Mezcla 1/1		151	1	7	2					65		24
10	Paget	23/79	241	12		4				5		50	30
	Hepat-biliar.	23/342	145	17							57		26
	Mezcla 1/1		209	14								61	23
11	Ict.Osbtru.	23/371	109	7		8			5			56	25
	Paget	23/79	241	12		4				5		50	30
	Mezcla 1/1		171	7		3				1		60	30
12	Ict.Osbtru.	23/156	41	27		3							70
	Paget	23/79	241	12		4				5		50	30
	Mezcla 1/1		127	15			2					68	14
13	Neopla.Gást.	23/89	616	30			2				55		12
	Cirro.etílica,	23/215	53	1		3	1					75	20
	Mezcla 1/1		549	22		3				59			16

ANEXO n° 4

MEZCLA DE HOMOGENADOS DE ORGANOS Y SUEROS PATOLOGICOS

A.F. : Actividad fosfatásica en U.I.

Dist.: Distancia recorrido por la banda anódica en cm.

N° Homog.de org. Diagnóst.suer.	Ident Sue.	Org. U.I.	A.F. U.I.	% activ. fosf. y posición banda en el gel															
				0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100					
1 Hueso	5 nec		82	19				10						71					
Paget.			524	5			2							93					
Mezcla.		05/01	110	10			5	8						68					
		05/02	164	12			4	4					5	75					
		05/03	230	13			4	2						81					
		05/05	172	9				5	3					83					
2 Hígado	5 nec		126	68				12			9			11					
Cirrosis			147	28			5	7				6	9	45					
Mezcla		05/01	106	19				20			6			55					
		05/02	110	24			7	7			4			58					
		05/03	94	21				5	2		4			68					
		05/05	116	26				8			7			58					
3 Riñón	2 Biop.		140	29		20				23	16			12					
Ins.re.cro.			41	10	2						1		37	50					
Mezcla		05/01	65	31		18				15	24			12					
		05/02	74	30		15				7	43			5					
		05/03	74	25		13				12	4			9					
		05/05	60	28	3	5	2			9	50			3					

MEZCLA DE HOMOGENADOS DE ORGANOS Y SUEROS PATOLOGICOS

N° Homog.de org. Diagnóst.suer.	Ident	Org. Sue.	A.F. U.I.	% activ. fosf. y posición banda en el gel										
				0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
4 Intestino Cirrosis Mezcla	6 Biop.		456	24			20				50			6
			147	28		5	7				6		9	45
		05/01	375	41			2	3	3	4	5		23	19
		05/02	366	23			10	7	5	1	10	21	20	3
		05/03	360	30			3	2		2	5		6	20
		05/05	303	32				15				1	24	28
5 Hígado Paget Mezcla	5 nec. 13		126	33				61						6
			524	5				2						93
		05/01	110	10			5	8					57	10
		05/02	164	12			4	4					76	4
		05/03	230	13			4	2						81
		05/05	172	9				5	3					83

ANEXO n° 5

HOMOGENADOS DE ORGANOS

=====

A.F. : Actividad fosfatásica en U.I.

Dist.: Distancia recorrido en cm por la banda anódica

N°	ORGANOS	TIPO MUESTRA	A.F. U.I.	% activ.fosf.y posición banda en el gel															
				0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100					
1	Intestino	Necrop.	24	29		8						31		34					
2	"	Necrop.	37	20			29					36		15					
3	"	Necrop.	47	31					39					31					
4	"	Biop.	202	19				15					48	18					
5	"	Biop.	437	34			25					28		8	6				
6	"	Biop.	456	24			20					50			6				
7	"	Biop.	294	24					12						65				
8	"	Biop.	394	30					18						53				
9	"	Biop.	23	30		5						50			16				
1	Hueso	Necrop.	77	32	1	3		3				49			11				
2	"	Necrop.	114	26	8			27	28			3			6				
3	"	Necrop.	124	31							69				1				
4	"	Necrop.	113	5				10							85				
5	"	Necrop.	82	19				10							71				
6	"	Necrop.	141	25								42			34				
7	"	Necrop.	151	25								15			60				
1	Riñón	Necrop.	45	63							32				5				
2	"	Biop.	140	29		20			23		16				12				
3	"	Necrop.	94	61					28				6		5				
4	"	Necrop.	140	38			27				25	8			2				
5	"	Necrop.	33	53								16	16		15				
6	"	Necrop.	45	70					17				7		6				
7	"	Necrop.	63	64									6		30				
8	"	Necrop.	43	58		1		2			3				36				

HOMOGENADOS DE ORGANOS

=====

A.F. : Actividad fosfatásica en U.I.

Dist.: Distancia recorrido en cm por la banda anódica

Nº	ORGANOS	TIPO MUESTRA	A.F. U.I.	% activ.fosf.y posición banda en el gel											
				0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
1	Hígado	Necrop.	394	24		2	3					46		25	
2	"	Necrop.	638	28			25					32		16	
3	"	Necrop.	563	28				6	6			15	22	24	
4	"	Necrop.	126	68			12					9		11	
5	"	Necrop.	126	33			61							6	
6	"	Necrop.	394	22		12			20			30		16	
7	"	Biop.	16	80				15					3	2	
8	"	Necrop.	159	29								21		50	
9	"	Necrop.	159	36							9			56	
10	"	Biop.	53	5								5		90	
1	Placenta	Biop.	200	28		24			7		27			15	
2	"	Biop.	250	35							31			24	
3	"	Biop.	732	32	0,5				30		29			9	
4	"	Biop.	391	24		21			42			7		7	
5	"	Biop.	135	30			7				31			32	
6	"	Biop.	452	13	8		12		26			20		21	

ANEXO n° 6

MEZCLA DE HOMOGENADOS DE ORGANOS
=====

A.F. : Actividad fosfatásica en U.I.

Dist.: Distancia recorrido por la banda anódica en cm.

N°	Organos	Ident.	A.F. U.I.	% activ.fosf.y posición banda en el gel										
				0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1	Hígado	4 N	126	68			12			9				11
	Hueso	4 N	113	5			10							85
	Híg-Hueso	1/1	140	32			6							62
2	Hígado	4 N	126	68			12			9				11
	Intesti.	6 B	456	24			20			50				6
	Híg-Intes.	1/1	572	2										56
3	Hígado	4 N	126	68			12			9				11
	Riñón	4 N	140	38		27				25	8			2
	Híg-Riñón	1/1	167	83			8			3				6
4	Hígado	4 N	126	68			12			9				11
	Hueso	4 N	113	5			10							85
	Riñón	4 N	140	38		27				25	8			2
	Híg-Hue-Riñ	1/1/1	428	44			9						7	40

ANEXO n° 7

MEZCLA DE HOMOGENADOS DE ORGANOS Y SUERO NORMAL

=====

A.F. : Actividad fosfatásica en U.I.

IDist.: Distancia recorrido por la banda anódica en cm.

N°	Organo Suero	Ident.	A.F. U.I.	% activ.fosf.y posición banda en el gel										
				0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
11	Riñón	1 N	45	63						32				5
	Suero	S'N	15	2						4				94
	Mezcla	1/1	33	48		7				9				36
12	Hueso	2 N	114	26	8		27	28			3			6
	Suero	S'N	15	2							4			94
	Mezcla	1/1	52	24		3		32				6		31
13	Hígado	2 N	565	28			25					32		16
	Suero	S'N	15	2							4			94
	Mezcla	1/1	178	30		8				39				23
14	Intest.	2 N	37	20			29				36			15
	Suero	S'N	15	2							4			94
	Mezcla	1/1	30	22			10					20		48
15	Placen.	1 B	200	28		24				7	27			15
	Suero	S'N	15	2							4			94
	Mezcla	1/1	107	49		6				7	8			30
16	Hígado	2 N	567	28			25					32		16
	Suero	S N	47	12							4		42	42
	Mezcla	1/1	297	31		10	3				21			35
17	Hígado	1 N	394	24		2	3					46		25
	Suero	S N	47	12							4		42	42
	Mezcla	1/1	140	25		3					14			59
18	Hueso	1 N	77	33		3		3				49		11
	Suero	S N	47	12							4		42	42
	Mezcla	1/1	59	22		2						13		63
19	Hueso	2 N	114	26	8		27		28		3			6
	Suero	S N	47	12							4		42	42
	Mezcla	1/1	99	33		2					25			40

MEZCLA DE HOMOGENADOS DE ORGANOS Y SUERO NORMAL

N°	Organo Suero	Ident.	A.F. U.I.	% activ.fosf.y posición banda en el gel										
				0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
10	Intest.	2 N	37	20			29				36			15
	Suero	S N	47	19		4		7			10			60
	Mezcla	1/1	45											
11	Intest.	1 N	24	29		8						31		34
	Suero	S N	47	11	1					4			42	42
	Mezcla	1/1	37	24								3		73
12	Riñón	4 N	140	38		27				25		8		2
	Suero	S N	47	11	1					4			42	42
	Mezcla	1/1	43	24										76
13	Riñón	1 N	45	63						32				5
	Suero	S N	47	11	1					4			42	42
	Mezcla	1/1	64	34								7		59
14	Placenta	5 B	135	30			7					31		32
	Suero	S N	47	11	1					4			42	42
	Mezcla	1/1	109	36			7		5		4			38
15	Placenta	1 B	200	28			24		7		27			15
	Suero	S.N.	47	11	1					4			42	42
	Mezcla	1/1	155	14			2				16			68
16	Hueso	4 N	113	5			10							85
	Suero	M	53	16			4							80
	Mezcla	1/1	53	13		7	7					62		11
17	Hígado	4 N	126	68			12				9			11
	Suero	M	53	16			4							80
	Mezcla	1/1	82	28			10							62
18	Intest.	8 B	394	30						18				53
	Suero	M	53	16			4							80
	Mezcla	1/1	209	23			4	7				20	25	21
19	Riñón	4 N	140	38			27			25	8			2
	Suero	M	53	16			4							80
	Mezcla	1/1	53	20		2	4	3	3	10	12	42		4

ANEXO nº8: CALCULO DE A.F. EN LAS MEZCLAS DE HOMOGENADOS Y SUEROS.

La A.F. de los homogenados, sueros y mezclas fueron calculados de esta forma:

En el ensayo nº1 del anexo, correspondiente a riñón, la F.A. del homogenado y del suero son 45 y 15 U.I. respectivamente. En la banda catódica del gel de ese ensayo, el homogenado aparece con el 65 % de la actividad total del gel y el suero con un 2 %.

La actividad de esas bandas en U.I. convencionales será

$$45 \times 0,65 = 29,3$$

$$15 \times 0,02 = 0,3$$

que es lo que aparece en la tabla en la columna de AF de organos y sueros.

Las AF de la mezcla, en la columna correspondiente, se obtienen

$$\text{Valor esperado} \quad (29,3 + 0,3) : 2 = 14,3$$

$$\text{Valor hallado} \quad 33 \times 0,48 = 15,8$$